

# **Fluoreszierende Insulin-Fusionsproteine zur Beurteilung des Granulationsstatus und der Exozytose von insulinproduzierenden Zellen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Kathrin Hatlapatka  
aus Hildesheim

1. Referent: Professor Dr. Ingo Rustenbeck  
2. Referent: Professor Dr. Markus Tiedge  
eingereicht am: 30.06.2008  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 24.07.2008

Druckjahr 2008

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Tagungsbeiträge**

HATLAPATKA K, ELSNER M, BALTRUSCH S, RUSTENBECK I: EGFP-tagging of insulin to label secretory granules in insulin-secreting cells. Diabetes und Stoffwechsel 13 (2004), S 39, V-85. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft in Hannover.

HATLAPATKA K, ELSNER M, BALTRUSCH S, JÖRNS A, MICHAEL D, CHOW R H, RUSTENBECK I: Labelling of insulin secretory granules by an EGFP-insulin fusion protein. EASD Islet Study Group Symposium 2004, Prien.

HATLAPATKA K, ELSNER M, BALTRUSCH S, JÖRNS A, MICHAEL D, CHOW R H, RUSTENBECK I: Labelling of Insulin Secretory Granules by an EGFP-Insulin Fusion Protein. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (2005); Vol. 371, Suppl. 1; R67, 281, 46. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz.

HATLAPATKA K, ELSNER M, BALTRUSCH S, JÖRNS A, MICHAEL D, CHOW R H, GUNZER M, RUSTENBECK I: Labelling of secretory granules by fluorescent insulin fusion proteins. Diabetes und Stoffwechsel 14 (2005); S 19,V-39. Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft in Berlin.

HATLAPATKA K, JÖRNS A, CHOW R H, RUSTENBECK I: Tracking of Insulin Secretory Granules by Fluorescent Insulin Fusion Proteins. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (2006); Vol. 372, Suppl. 1; S 70, 247, 47. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz.

HATLAPATKA K, WIENBERGEN A, JÖRNS A, RUSTENBECK I: Drug-Induced Desensitization of Insulin Secretion. EASD Islet Study Group Symposium 2006, Helsingör, Dänemark.

HATLAPATKA K, WIENBERGEN A, JÖRNS A, RUSTENBECK I: Drug-Induced Desensitization of Insulin Secretion. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (2007); Vol. 375, Suppl. 1; S 49; 219, 48. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz.

HATLAPATKA K, WIENBERGEN A, JÖRNS A, RUSTENBECK I: Drug-Induced Desensitization of Insulin Secretion. Diabetologie und Stoffwechsel; S1 (2007); 2: S9-S142; S87, P-241, Jahrestagung der Deutschen Diabetes Gesellschaft in Hamburg.

HATLAPATKA K, WIENBERGEN A, JÖRNS A, RUSTENBECK I: Role of the B-Cell granulation state in drug-induced desensitization of insulin secretion. Diabetologia (2007) 50:[Suppl1]S1–S538; S213, 43. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes (EASD) in Amsterdam.

HATLAPATKA K, CHOW R H, JÖRNS A, RUSTENBECK I: labelling of secretory granules with fluorescent insulin fusion proteins – a useful approach? EASD Islet Study Group Symposium 2007, Brüssel, Belgien.



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2003 bis Juli 2008 am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinischer Pharmazie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig angefertigt.

Es gibt viele Menschen, die auf ihre Weise ihren Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Ihnen möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich danken, auch wenn sie hier teilweise nicht namentlich erwähnt werden.

Herrn Prof. Ingo Rustenbeck danke ich für die interessante Themenstellung und für die hilfreiche Betreuung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Sigurd Lenzen und seinen Mitarbeitern danke ich für die Möglichkeit, molekularbiologische Arbeitstechniken im Institut für Klinische Biochemie der MH Hannover erlernen zu können; ganz besonders Simone Baltrusch, Matthias Elsner und Stephan Lortz, die mir immer mit Rat und Tat beiseite standen.

Frau Prof. Anne Jörns und Frau Sommerfeld danke ich herzlich für die Durchführung der elektronenmikroskopischen und immunohistochemischen Untersuchungen.

Herrn Prof. Robert H. Chow und Dr. Darren Michael danke ich für die Durchführung der TIRF-mikroskopischen Untersuchungen unseres Insulin-EGFP-Konstrukts.

Herrn Prof. Roger Y. Tsien danke ich für die Zurverfügungstellung des mRFP und tdimer.

Herrn Sven Pape danke ich für seine stets hilfreiche Unterstützung bei zahlreichen technischen Problemen und Herausforderungen.

Allen Kolleginnen und Kollegen danke ich für eine angenehme Zusammenarbeit. Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Carolin Rattunde für die Hilfe bei der Durchführung der Zellkultur, der molekularbiologischen Arbeiten und der Proteinbestimmung mittels Western Blot; und bei Verena Lier-Glaubitz für die Hilfe bei der Durchführung der Calcium-Messungen, Insel-Umströmungen und den ELISA-Bestimmungen. Mein Dank gilt auch Angela Hahlbohm für die Unterstützung bei der Etablierung und Durchführung der ATP-Bestimmung.

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Definition Diabetes mellitus.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Medikamentöse Therapie des Typ 2 Diabetes .....</b>	<b>8</b>
1.2.1. Etablierte Behandlungsmöglichkeiten.....	8
1.2.2. Neue Ansätze in der Diabetes-Therapie.....	9
<b>1.3. Insulinsekretion der <math>\beta</math>-Zellen des Pankreas .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4. Imidazoline als Basis für die Entwicklung von glucoseselektiven     insulinotropen Pharmaka.....</b>	<b>14</b>
<b>1.5. Perspektiven der Erforschung der Desensitisierung der Insulinsekretion .....</b>	<b>18</b>
<b>1.6. Exozytose der Insulin-Sekretgranula.....</b>	<b>19</b>
<b>2. ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Biochemikalien und Zellkulturreagenzien.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Zellkultur .....</b>	<b>27</b>
3.2.1. Sterilisierung von verwendeten Materialien und Lösungen .....	27
3.2.2. Verwendete Lösungen .....	27
3.2.3. Zellpassagierung und Erhaltungskultur von MIN6-Zellen .....	28
3.2.4. Bestimmung der Zellzahl mittels Häemocytometer .....	29
3.2.5. Kryokonservierung und Auftauen von eingefrorenen MIN6-Zellen.....	29
3.2.6. Insulinproduzierende Zelllinie MIN6.....	30
3.2.7. MIN6-Pseudoinseln .....	31
3.2.8. Insulinproduzierende Zelllinie RINm5F.....	32
3.2.9. Insulinproduzierende Zelllinie INS1-E.....	33
<b>3.3. Isolierung von Langerhans'schen Inseln, Einzelzellgewinnung und Primärkultur .....</b>	<b>34</b>
3.3.1. Verwendete Lösungen .....	34
3.3.2. Isolierung der Langerhans'schen Inseln und anschließende Einzelzellgewinnung.....	36
<b>3.4. Allgemeine molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>38</b>
3.4.1. Verwendete Lösungen .....	38
3.4.1.1. Bakterienkulturmedien.....	38
3.4.1.2. Puffer .....	38
3.4.1.3. Antibiotika .....	39
3.4.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	39
3.4.3. Agarosegelelektrophorese .....	41
3.4.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	42
3.4.5. Restriktion und Ligation von Plasmid DNA .....	42
3.4.6. Herstellung elektrokompenter Bakterien und Transformation mittels Elektroporation.....	44
3.4.7. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	45
3.4.8. Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	46

<b>3.5. Konstruktion der Vektor-Plasmide.....</b>	<b>46</b>
3.5.1. Expressionsvektor pEGFP-N1/hIns-EGFP .....	47
3.5.2. Expressionsvektor pEGFP-N1/hIns-tdimer .....	48
3.5.3. Expressionsvektor pEGFP-N1/hIns-timer .....	49
<b>3.6. HIV I-basiertes lentivirales Gentransfersystem .....</b>	<b>50</b>
3.6.1. Vektor Plasmid pRRL-CGW-SIN.....	51
3.6.2. Envelope Plasmid pcDNA3/MD.G .....	53
3.6.3. Packaging Plasmid pCMVΔR8.93 .....	54
3.6.4. Konstruktion des lentiviralen Vektorplasmids pRRL-CGW-SIN/hIns-EGFP .....	55
3.6.5. Produktion replikationsdefizienter viraler Vektoren.....	55
3.6.5.1. Verwendete Lösungen .....	56
3.6.5.2. Co-Transfektion der lentiviralen Plasmide, Ernte und Aufkonzentrierung der produzierten lentiviralen Partikel.....	56
<b>3.7. Transfektion von insulinproduzierenden Zelllinien .....</b>	<b>58</b>
3.7.1. Transiente Transfektion .....	58
3.7.1.1. Polyethylenimin-basiert .....	58
3.7.1.2. Elektroporation .....	58
3.7.2. Stabile Transfektion .....	59
<b>3.8. Lentivirale Infektion von MIN6-Zellen und primären β-Zellen .....</b>	<b>60</b>
<b>3.9. Western Blot.....</b>	<b>62</b>
3.9.1. Verwendete Lösungen .....	62
3.9.2. Herstellung von Gewebeextrakten.....	63
3.9.3. Bestimmung des Gesamtproteingehaltes nach Bradford .....	63
3.9.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	63
3.9.5. Western-Blot-Transfer.....	64
3.9.6. Western-Blot-Detektion .....	65
<b>3.10. Fluoreszenzmikroskopie .....</b>	<b>66</b>
3.10.1. Die Mikroskopfluorimetrie mit digitaler Bildverarbeitung.....	66
3.10.1.1. Mikrofluorimetrische Messung der fluoreszierenden Insulin-Fusionsproteine .....	67
3.10.1.2. Permeabilisierung der Plasmamembran von MIN6-Zellen mit Digitonin.....	70
3.10.1.3. Beladung von MIN6-Zellen mit Rhodamin123 .....	71
3.10.1.4. Beladung von insulinproduzierenden Zellen und NMRI-Maus-Inseln mit verschiedenen Fluoreszenzindikatoren .....	71
3.10.1.5. Mikrofluorimetrische Messung der cytosolischen Calciumkonzentration.....	72
3.10.2. TIRF-mikroskopische Messung der fluoreszierenden Insulin-Fusionsproteine .....	74
3.10.2.1. Das Prinzip der TIRF-Mikroskopie .....	75
3.10.2.2. Durchführung der TIRF-Mikroskopie .....	76
<b>3.11. Elektronenmikroskopische Darstellung der Insulin-Sekretgranula .....</b>	<b>77</b>
<b>3.12. Immunohistochemische Darstellung von EGFP und C-Peptid in MIN6-Zellen.....</b>	<b>77</b>
<b>3.13. Dynamische Messung der Insulinsekretion .....</b>	<b>78</b>
3.13.1. Durchführung der Perifusion .....	78
3.13.2. Bestimmung des Insulingehalts .....	80
3.13.3. Datenauswertung .....	80

<b>3.14. Statische Messung der C-Peptid- und Insulinsekretion in MIN6-Pseudoinseln.....</b>	<b>81</b>
3.14.1. Probengewinnung .....	81
3.14.2. Bestimmung des C-Peptid-Gehalts.....	81
3.14.3. Bestimmung des Insulin-Gehalts .....	82
<b>3.15. Bestimmung von ATP und ADP in NMRI-Maus-Pankreasinseln.....</b>	<b>82</b>
3.15.1. Test-Prinzip der luminometrischen Bestimmung .....	82
3.15.2. Verwendete Lösungen .....	83
3.15.3. Durchführung .....	84
3.15.3.1. Inkubation und Extraktion.....	84
3.15.3.2. ATP- und ADP-Bestimmung.....	85
3.15.3.3. Darstellung der Ergebnisse .....	86
<b>3.16. Die Patch-Clamp-Technik.....</b>	<b>86</b>
3.16.1. Aufbau des Messstands.....	86
3.16.2. Versuchsdurchführung .....	88
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>90</b>
<b>4.1. Fluoreszierendes Insulin-EGFP-Fusionsprotein als Marker für Insulin-Sekretgranula .....</b>	<b>90</b>
4.1.1. Die Linker-Sequenz zwischen dem Insulin und dem EGFP-Anteil des Fusionsproteins.....	91
4.1.2. Nachweis der subzellulären Lokalisation des Insulin-EGFP-Fusionsproteins.....	92
4.1.3. Ultrastruktur der Sekretgranula von stabil transfizierten MIN6-Zellen .....	94
4.1.4. Nachweis der regulären Insulin-Prozessierung in transfizierten MIN6-Zellen durch Antikörper-Färbung des C-Peptids .....	94
4.1.5. Nachweis der Exozytose von Insulin-EGFP durch transfizierte insulinproduzierende Zellen .....	95
4.1.6. Nachweis der depolarisationsinduzierten Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration in stabil transfizierten MIN6-Zellen.....	97
<b>4.2. Expression von Insulin-EGFP in MIN6-Zellen und <math>\beta</math>-Zellen nach lentiviraler Infektion .....</b>	<b>99</b>
<b>4.3. Fluoreszierendes Insulin-tdimer2(12) Fusionsprotein als Marker     für Insulin-Sekretgranula .....</b>	<b>103</b>
4.3.1. Nachweis der subzellulären Lokalisation des Insulin-tdimer-Fusionsproteins durch Permeabilisierung der Plasmamembran transient transfizierter MIN6-Zellen .....	103
4.3.2. Abtrennung der tdimer-Fluoreszenz von der Autofluoreszenz von MIN6-Zellen.....	104
4.3.3. Unterschied in der Fluoreszenzmarkierung von transient und von stabil transfizierten MIN6-Zellen .....	105
4.3.4. Vergleich der subzellulären Lokalisation der Sekretgranula von Insulin-EGFP mit der von Insulin-tdimer.....	107
4.3.5. Induzierte Veränderung des Fluoreszenzmusters von tdimer-transfizierten MIN6-Zellen ..	108
4.3.6. Abgrenzung der mitochondrialen Eigenfluoreszenz von der granulären Fluoreszenz des Insulin-tdimer-Fusionsproteins .....	110
<b>4.4. Fluoreszierendes Insulin-timer-Fusionsprotein als Marker für Insulin-Sekretgranula .....</b>	<b>112</b>
<b>4.5. Insulinsekretorische Charakteristika von Insulin-Fusionsproteinen     in transfizierten MIN6-Zellen.....</b>	<b>115</b>
4.5.1. Insulinsekretion von MIN6-Pseudoinseln.....	115
4.5.2. Insulinsekretion von transfizierten MIN6-Pseudoinseln .....	117

<b>4.6. Charakterisierung der C-Peptid-Sekretion von transfizierten MIN6-Zellen .....</b>	<b>120</b>
<b>4.7. Desensibilisierung der Insulinsekretion .....</b>	<b>124</b>
4.7.1. Desensibilisierung der Insulinsekretion durch zwei unterschiedliche Hemmstoffe des $K_{ATP}$ -Kanals .....	124
4.7.2. Einfluss der Desensibilisierung auf die cytosolische Calciumkonzentration .....	126
4.7.3. Einfluss der Desensibilisierung auf den Gehalt an Insulingranula in Mausinseln – elektronenmikroskopische Untersuchungen .....	127
4.7.4. Einfluss der Desensibilisierung auf den Granulationsstatus von MIN6-Zellen – fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen .....	129
4.7.5. Einfluss einer Depolarisation auf den Granulationsstatus von MIN6-Zellen.....	131
4.7.6. Einfluss der Desensibilisierung auf die Expression von PDX-1 .....	133
4.7.7. Einfluss der Desensibilisierung auf den ATP- und ADP-Gehalt in Maus-Inseln .....	134
 <b>5. DISKUSSION .....</b>	 <b>136</b>
5.1. Fluoreszenzmarkierung von Insulin-Sekretgranula-grundsätzliche Erwägungen .....	136
5.2. Fluoreszierende Insulin-Fusionsproteine als Marker für Insulin-Sekretgranula .....	137
5.3. Vektorsysteme zum effektiven Transfer von Fremd-DNA in Säugerzellen - ein Vergleich.....	143
5.4. Charakteristika der Insulin- und C-Peptidsekretion von transfizierten MIN6-Zellen .....	145
5.5. Mechanismen der Desensibilisierung der Insulinsekretion .....	149
 <b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	 <b>156</b>
 <b>7. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	 <b>159</b>
 <b>8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	 <b>176</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Definition Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist in den westlichen Industrieländern die bedeutendste Stoffwechselerkrankung (HAUNER et al. 1992), die immer dann vorliegt, wenn der Blutzuckerspiegel chronisch erhöht ist. Nach den Kriterien der American Diabetes Association (ADA) spricht man von Diabetes, wenn die venöse Plasmaglukosekonzentration nüchtern mehr als 126 mg/dl (7,0 mmol/l) beträgt, oder wenn nach Durchführung eines oralen Glucose-Toleranz-Tests (OGTT) die gemessene Plasmaglukosekonzentration bei mehr als 200 mg/dl (11,1 mmol/l) liegt (KERNER W et al. 2004). Es werden vier Hauptgruppen von Diabetes Mellitus unterschieden:

<b>I. Typ 1 Diabetes</b>	
β-Zell-Zerstörung, die üblicherweise zum absoluten Insulinmangel führt	
A. Immunologisch vermittelt	B. Idiopathisch
<b>II. Typ 2 Diabetes</b>	
kann sich von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz erstrecken	
<b>III. Andere spezifische Diabetes-Typen</b>	
<b><u>A. Genetische Defekte der B-Zell-Funktion, z.B.</u></b>	
• Chromosom 7, Glucokinase (GCK) (frühere Bezeichnung MODY 2)	• Chromosom 20, HNF-4α (frühere Bezeichnung MODY 1)
<b><u>B. Genetische Defekte der Insulinwirkung, z.B.</u></b>	
• Typ A Insulinresistenz	• Lipatrophischer Diabetes
<b><u>C. Erkrankungen des exokrinen Pankreas, z.B.</u></b>	
• Pankreatitis	• Zystische Fibrose
<b><u>D. Endokrinopathien, z. B.</u></b>	
• Akromegalie	• Hyperthyreose
<b><u>E. Medikamenten- oder chemikalieninduziert, z.B.</u></b>	
• Neuroleptika (insbes. Clozapin, Olanzapin)	• Glukokortikoide
<b><u>F. Infektionen, z. B.</u></b>	
• Kongenitale Rötelninfektion	• Zytomegalievirus
<b><u>G. Seltene Formen des immunvermittelten Diabetes, z.B.</u></b>	
• „Stiff-Person“-Syndrom	• Antiinsulinrezeptorantikörper
<b><u>H. Andere, gelegentlich mit Diabetes assoziierte genetische Syndrome, z.B.</u></b>	
• Down-Syndrom	• Porphyrie
<b>IV. Gestationsdiabetes</b>	

**Tab.1.1** Nosologische Klassifikation des Diabetes mellitus [nach ADA, 1997, EK IV; Alberti et al, 1998b, EK IV]

Mittlerweile sind in Deutschland 7 – 8% aller Erwachsenen an Diabetes erkrankt (einschließlich der nicht diagnostizierten Fälle) (HAUNER 1998), (GIANI G *et al.* 2004), wobei ca. 85% Typ 2 Diabetes Patienten sind. Sowohl Typ 1 als auch Typ 2 nehmen derzeit zu. Der Typ 1 Diabetes ist gekennzeichnet durch eine progrediente Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas. Es besteht ein Insulinmangel mit einem Insulinmangelsyndrom, das gekennzeichnet ist durch die klassischen Zeichen Polyurie, Polydipsie, Ketoazidose und Gewichtsverlust. Das Spektrum der Manifestation des Insulinmangels reicht von der gestörten Glucosetoleranz über mäßig erhöhte Nüchternblutglucosewerte bis hin zur abrupt einsetzenden absoluten Insulinbedürftigkeit mit ketoazidotischer Stoffwechselentgleisung und möglichem Bewusstseinsverlust (KERNER W *et al.* 2004). Ungefähr 5% aller Diabetes Patienten in Deutschland leiden an einem Typ 1 Diabetes (GIANI G *et al.* 2004).

Die weltweit häufigste Diabetesform ist mittlerweile der Typ 2 Diabetes. Im Jahr 2000 waren insgesamt 151 Millionen Menschen an Typ 2 Diabetes erkrankt und es wird geschätzt, dass diese Zahl durch Faktoren wie Überernährung, Übergewicht, körperliche Inaktivität und Stress weltweit bis zum Jahr 2025 auf 300 Millionen ansteigen wird (ZIMMET *et al.* 2001). Der überwiegende Teil (80 – 90%) der Patienten mit Typ 2 Diabetes ist übergewichtig. Sie zeigen häufig eine verminderte Ansprechbarkeit des peripheren Gewebes auf Insulin (sogenannte Insulinresistenz) (BODEN 1997). Entsprechend dem polygenetischen Charakter des Typ 2 Diabetes ist auch die Insulinresistenz multifaktoriell, und kann sowohl durch die absolute Zunahme der Fettgewebsmenge bedingt sein, als auch durch Veränderungen der zellulären Signalverarbeitung. Folge ist eine Glucoseintoleranz (Prädiabetes), d.h. die Unfähigkeit des Organismus, resorbierte Glucose aus dem Blut in Fett- und Muskelzellen zu transportieren. Im Anfangsstadium der Erkrankung kommt es dann zu einer Hyperinsulinämie. Einen manifesten Diabetes entwickeln dann diejenigen Patienten, deren endokrines Pankreas nicht in der Lage ist, die Insulinresistenz durch hinreichende Steigerung der Insulinsekretion zu kompensieren. Insofern ist eine Störung in der Insulinsekretionsfähigkeit ein wesentlicher Bestandteil für die Manifestation des Typ 2 Diabetes (CAHILL 1988), (FERRANNINI 1998), (GERICH 1998).

Die bei diesem Krankheitsbild vorliegende chronische Hyperglykämie kann diabetesspezifische Mikroangiopathien hervorrufen (GIANI G et al. 2004). Unter dem Begriff Mikroangiopathien werden Schäden an den kleinen Blutgefäßen, den Blutkapillaren, zusammengefasst. Diese Blutkapillaren versorgen unter anderem die Netzhaut des Auges (Retina), die Niere und Neuronen mit Nährstoffen. Schädigungen dieser Kapillaren z.B. infolge einer Glykosilierung des Endothels durch erhöhte Blutglucosekonzentrationen, können zu Retinopathien mit Erblindung, Nierenversagen mit Dialysepflichtigkeit und Neuropathien führen. Durch Neuropathien kann die Tastsensibilität stark reduziert werden. Die schlimmste Folge einer unzureichenden Tastsensibilität stellt die Entwicklung eines sogenannten diabetischen Fußes dar. Darunter werden Verletzungen an den Füßen der Patienten mit Diabetes zusammengefasst, die sich aufgrund der verminderten Wundheilung der Betroffenen nur selten zurückbilden. Bei ausbleibender Behandlung kann ein diabetischer Fuß eine Amputation dieses Körperteiles notwendig machen (BOULTON 2000), (HELLER et al. 2004).

Schäden an den großen Blutgefäßen werden als Makroangiopathien bezeichnet. Makroangiopathien werden hauptsächlich durch Atherosklerose ausgelöst. Durch eine diabetische Stoffwechsellage wird das Auftreten atherosklerotischer Veränderungen und den damit verbundenen Folgeerkrankungen, die vorwiegend an Herz, Gehirn und den peripheren Arterien auftreten, begünstigt. Dieses kann u.a. zu Herzinfarkt und Schlaganfall führen (GIANI G et al. 2004). Die Mikro- und Makroangiopathien werden als Spätschäden eines Diabetes bezeichnet. Die ersteren senken v.a. die Lebensqualität und die letzteren auch die Lebenserwartung der Betroffenen.

Patienten mit Typ 2 Diabetes versterben mittlerweile nicht mehr an diabetischem Koma oder Hypoglykämien sondern an den kardiovaskulären Erkrankungen (GIANI G et al. 2004). Deswegen sollte eine Therapie zusätzlich zur Korrektur des Blutzuckerspiegels, wenn notwendig auch den Fettstoffwechsel und den Blutdruck der Patienten verbessern (ALBERTI 2001). Ziele der Therapie des Typ 2 Diabetes ist es, die Lebensqualität der Patienten zu erhalten oder wiederherzustellen, akute Stoffwechselkomplikationen wie z.B. das diabetische Koma und Hypoglykämien zu vermeiden, die Entstehung von Spätschäden hinauszuzögern, eintretende Komplikationen zu therapieren und Risikofaktoren wie Hypertonie und Dyslipidämie zu senken (HÄRING und MATTHAEI 2006). Zu beachten ist, dass die



Therapie eines Diabetes individuell auf die Lebenssituation des Patienten angepasst werden muss. So sollten z.B. die Begleiterkrankungen, das Lebensalter und die Lebenserwartung bei der Therapieplanung berücksichtigt werden (HÄRING und MATTHAEI 2006).

## **1.2. Medikamentöse Therapie des Typ 2 Diabetes**

### **1.2.1. Etablierte Behandlungsmöglichkeiten**

Aufgrund der chronisch progredienten Natur und der folgeschweren Spätschäden der Erkrankung ist die antihyperglykämische Therapie von besonderer Bedeutung. Hierbei spielen zu Beginn und auch in jeder anderen Phase der Erkrankung die nicht-pharmakologischen Therapiemaßnahmen (Ernährungstherapie, Bewegungstherapie) mit dem Ziel der Gewichtsreduktion eine große Rolle. Sollten diese ersten Therapiemaßnahmen nicht ausreichen, so ist eine medikamentöse Therapie erforderlich, um den Erhalt bzw. die Wiederherstellung der Lebensqualität zu gewährleisten. Als ideales Therapieziel wird eine praktische Normalisierung angestrebt und der Surrogatparameter  $HbA_{1c}$ , verwendet, der einen Wert von 6,5% haben sollte. Zu Beginn der medikamentösen Therapie werden orale Antidiabetika (OAD) eingesetzt. Mittel der Wahl, besonders bei übergewichtigen Patienten, ist derzeit das Biguanid Metformin. Es hemmt die hepatische Gluconeogenese (WOLLEN und BAILEY 1988a; WOLLEN und BAILEY 1988b) und steigert die Aufnahme von Glucose ins Fettgewebe und in die Skelettmuskulatur (BAILEY und TURNER 1996).

Bei normalgewichtigen Typ 2 Diabetikern werden vorwiegend Sulfonylharnstoffe verwendet (HÄRING et al. 2003). Der Wirkmechanismus der Sulfonylharnstoffe besteht darin, dass sie  $K_{ATP}$ -Kanäle schließen und damit den Signalweg über Depolarisation der  $\beta$ -Zellen und Calciumerhöhung bis zur Insulinsekretion in Gang setzen (PANTEN 1989). Die Wirkung von Sulfonylharnstoffen wird durch erhöhte Blutglucosekonzentrationen verstärkt, kann aber auch schon bei basalen Blutglucosespiegeln erfolgen. Daher können Sulfonylharnstoffe eine unter Umständen lebensbedrohliche Hypoglykämie auslösen.

Weiterhin stehen als Pharmaka mit insulinsekretionssteigernder Wirkung die Sulfonylharnstoff-Analoga Repaglinid und Nateglinid zur Verfügung. Sie haben einen

schnelleren Wirkungseintritt was eine mahlzeitnahe Applikation erlaubt, und gegenüber den Sulfonylharnstoffen den Vorteil einer selektiven Absenkung des postprandialen Blutzuckerspiegels erbringen soll (NORMAN und RABASEDA 2001), (PRATLEY et al. 2001).

Rosiglitazon und Pioglitazon als Vertreter der Thiazolidindione sind selektive Agonisten am PPAR $\gamma$ -Rezeptor und vermindern die Insulinresistenz im Fettgewebe, Skelettmuskel und Leber (MUDALIAR und HENRY 2001), (STUMVOLL und HARING 2002).

Die  $\alpha$ -Glucosidase-Hemmstoffe, z. B. Acarbose, hemmen kompetitiv intestinale  $\alpha$ -Glucosidasen und verringern somit die Spaltung von Disacchariden, wodurch sie die Resorption von Glucose aus dem Dünndarm verzögern. Dadurch können postprandiale Blutzuckerspitzen vermieden werden (LEBOVITZ 1997).

Wird mit diesen Medikamenten kein ausreichender Therapieerfolg erzielt, oder kommt es im Laufe der Behandlung zum Verlust der initial vorhandenen Wirkung sowohl bei Sulfonylharnstoffen als auch Metformin (sog. Sekundärversagen) (UKPDS 1998), (MATTHEWS et al. 1998), muss der Erkrankte auf die Therapie mit Insulin umgestellt werden.

### 1.2.2. Neue Ansätze in der Diabetes-Therapie

Unter physiologischen Bedingungen erfolgt eine glucoseselektive Steigerung der Sekretion durch Acetylcholin, Glucagon, GLP-1 (glucagon like peptide 1), GIP (glucose-dependent insulin-releasing peptide früher gastric inhibitory peptide) und VIP (vasoactive intestinal peptide). GLP-1 ist ein Peptid aus 30 Aminosäuren und seine Aminosäuresequenz ist zu 50% identisch mit der Aminosäuresequenz des Glucagons (AHREN 1998). Es wird als Hormon von L-Zellen des distalen Ileums und des Colons gebildet und während der Nahrungsaufnahme in das Blut abgegeben (CREUTZFELDT 2001). An den  $\beta$ -Zellen des Pankreas bewirkt es eine Steigerung der Insulinsekretion bei gegenüber Basalwerten erhöhten Glucosekonzentrationen (AHREN 1998), (MACDONALD et al. 2002). GLP-1 ist nur kurz wirksam, da es sehr schnell durch die Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) abgebaut wird. Seine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) beträgt 1,5 - 2 Minuten (AHREN 1998), (HOLST und DEACON 1998). Um die GLP-1-Wirkungen therapeutisch nutzen zu können, mussten GLP-1 Analoga entwickelt werden, die resistent gegenüber dem Abbau durch Dipeptidylpeptidase IV sind (GALLWITZ et al. 2000), (MEIER et al. 2003).

Der erste zur Therapie zugelassene Vertreter der neuen Antidiabetika-Klasse der Inkretin-Mimetika ist Exenatide (synthetisches Exendin-4). Das subcutan zu injizierende Analogon des intestinalen Peptidhormons GLP-1 greift auf verschiedenen Ebenen ein (MEIER und NAUCK 2005). Durch Angriff an den  $\beta$ -Zellen wird die Glucose-induzierte Insulinsekretion verstärkt (dabei besteht keine Hypoglykämiegefahr), die Insulinbiosynthese gesteigert und wahrscheinlich auch die Anzahl der  $\beta$ -Zellen vermehrt. Ferner werden Glucagonsekretion, Magenentleerung und Appetit gehemmt.

Ein weiterer Ansatz, die GLP-1 Wirkung auch therapeutisch nutzen zu können, ist die Entwicklung von Hemmstoffen der Dipeptidylpeptidase IV. Seit 2007 stehen mit Vildagliptin und Sitagliptin als erste Vertreter dieser Gruppe neue Substanzen zur Therapie des Typ 2 Diabetes mellitus zur Verfügung.

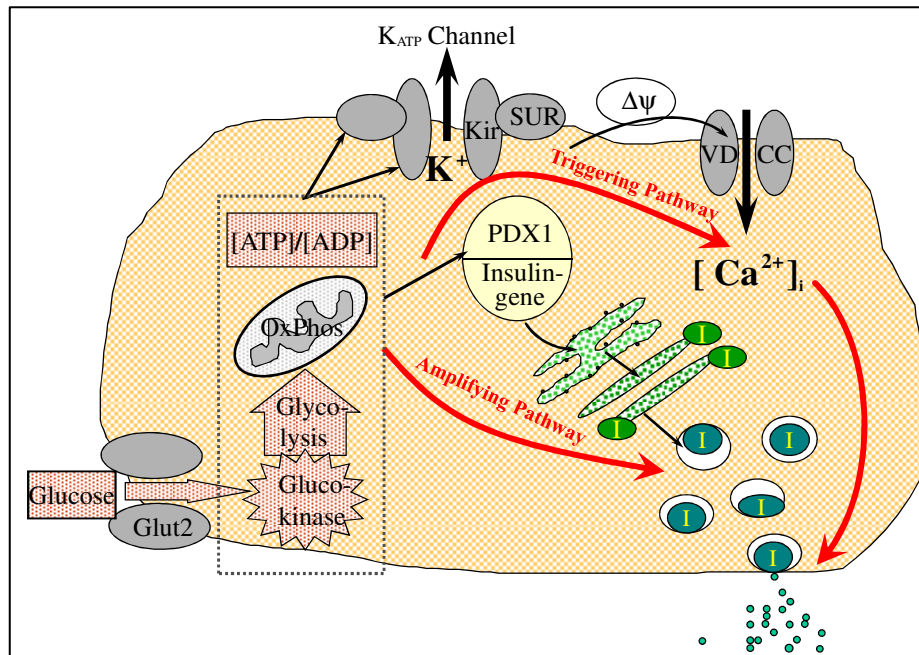
### **1.3. Insulinsekretion der $\beta$ -Zellen des Pankreas**

Die Langerhans'schen Inseln liegen verstreut im Pankreas und machen ca. 2 - 3% des gesamten Organs aus. Das menschliche Pankreas enthält etwa eine Million Langerhans'sche Inseln mit jeweils ca. 3000 hormonproduzierenden Zellen. Die Pankreasinseln sind kleine rundliche Zellverbände mit einem Durchmesser zwischen 75  $\mu\text{m}$  und 300  $\mu\text{m}$ . In den Pankreasinseln kommen vier verschiedene Zelltypen in unterschiedlichen Mengenverhältnissen vor. Beim Menschen machen die  $\beta$ -Zellen ca. 65 - 70% der Zellen aus und befinden sich vor allem in der Mitte der Insel. Sie produzieren das blutzuckersenkend wirkende Hormon Insulin. Vorwiegend am Rand der Insel finden sich die Glucagon-sezernierenden  $\alpha$ -Zellen, die ca. 20% des Zellanteils in einer Pankreasinsel ausmachen. Daneben kommen noch Somatostatin-sezernierende  $\delta$ -Zellen und pankreatisches Polypeptid-produzierende PP-Zellen mit einem Zellanteil von ca. 10% vor (THEWS 2007). Unter physiologischen Bedingungen stellt die Erhöhung der Blutglucosekonzentration für die  $\beta$ -Zellen des Pankreas den wichtigsten Reiz zur Ausschüttung des Peptidhormons Insulin dar. Moduliert wird die Insulinsekretion durch einige gastrointestinale Hormone wie z.B. GIP und GLP-1 (CREUTZFELDT 2001) und durch das vegetative Nervensystem (ASHCROFT und RORSMAN 1989). Die Aktivierung von m-Cholinozeptoren (SAMOLS und WEIR 1979) steigert die Sekretion, wohingegen eine Aktivierung von  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren (ROBERTSON und PORTE 1973), (SAMOLS und WEIR 1979) die Insulinsekretion hemmt.

Voraussetzung für die Glucose-induzierte Steigerung der Insulinsekretion ist die Verstoffwechselung der Glucose (COORE und RANDLE 1964), (ASHCROFT und RANDLE 1968). Die Beziehung zwischen Glucoseerhöhung und Insulinsekretion verläuft sigmoidal (TURNER et al. 1979) mit der größten Steigung zwischen 6 und 12 mmol/l bei Menschen (BYRNE et al. 1996) und zwischen 8 und 17 mmol/l bei Albinomäusen (LENZEN 1979). Die biphasische Freisetzung des Insulins aus der  $\beta$ -Zelle wird in der Regel durch einen stimulatorischen Glucose-Plasmaspiegel ( $> 7$  mM) initiiert (DEAN und MATTHEWS 1968). Mittels des niedrigaffinen GLUT2-Transporters ( $K_M$ -Wert: 20 mM), der in hoher Dichte in der Zellmembran der  $\beta$ -Zellen des Pankreas vorkommt (SCHUIT et al. 2001), wird vermehrt Glucose in das Cytosol aufgenommen. Durch die Verstoffwechselung der Glucose kommt es zur Aktivierung des Energiestoffwechsels der  $\beta$ -Zelle (MATSCHINSKY 1996). Der erste Schritt der Glucoseverstoffwechselung in der Glykolyse wird durch das Enzym Glucokinase katalysiert (LENZEN und PANTEN 1988), (GERMAN 1993), ein Enzym, das aufgrund eines hohen  $K_M$ -Wertes im millimolaren Bereich (10 mM) seine Aktivität gerade im Bereich der (patho)physiologischen Blutglucosekonzentrationen variiert (MEGLASSON und MATSCHINSKY 1986). Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, wird in den Matrixraum der Mitochondrien transportiert, zu Acetyl-CoA umgesetzt und im Citratcyclus zu  $\text{CO}_2$  abgebaut. Durch Reaktionen des Citratcyclus werden Nucleotide wie NADH und  $\text{FADH}_2$  gebildet. Diese Nucleotide bewirken an der inneren Mitochondrienmembran den Aufbau eines Protonengradienten (MITCHELL und MOYLE 1967). Dieser Gradient stellt die Voraussetzung für die nachfolgende oxidative Phosphorylierung dar. In dieser wird der aufgebaute Protonengradient durch das Enzym ATP-Synthase zur ATP-Bildung bei gleichzeitiger Reduktion von Sauerstoff zu Wasser genutzt. Ein Ergebnis des gesteigerten Stoffwechsels ist ein Anstieg des ATP- und eine Reduktion des ADP-Gehalts und damit eine Steigerung der sogenannten ATP/ADP-Ratio im Cytosol der  $\beta$ -Zellen (MEGLASSON et al. 1989), (GHOSH et al. 1991), (HENQUIN et al. 1994), (PRENTKI 1996).

Die gesteigerte ATP-Konzentration in den Zellen führt zu einer Blockade des ATP-empfindlichen Kaliumkanals ( $K_{\text{ATP}}$ -Kanal) in der Plasmamembran der  $\beta$ -Zellen. Dieser Kanal setzt sich aus jeweils 4 Sulfonilharnstoffrezeptoren vom Typ 1 (SUR1) und 4 porenbildenden Untereinheiten ( $K_{\text{ir}}6.2$ ) zusammen. Der  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal stellt einen einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanal dar ( $K_{\text{ir}}$  = Kalium inward rectifying)

(NICHOLS und LOPATIN 1997). Dieses bedeutet, dass er unter *in vitro* Bedingungen die Kalium-Ionen bevorzugt in das Zellinnere leitet. Durch Bindung von ATP an eine intrazellulär gelegene Struktur des Kaliumkanals am SUR1 (BRYAN und AGUILAR-BRYAN 1999) wird die Pore des Kanals geschlossen und damit der Kaliumstrom verringert. Anschließend kommt es durch einen bis jetzt noch nicht näher identifizierten Einwärtsstrom zur Depolarisation der Plasmamembran der  $\beta$ -Zelle (ASHCROFT und RORSMAN 1989), (DUNNE et al. 1994), (ATWATER et al. 1996). Depolarisation bedeutet, dass die über der Plasmamembran aufgebaute Spannung von einem Ruhewert um -70 mV auf Werte um -40 mV ansteigt. Die durch Glucose ausgelöste Depolarisation der  $\beta$ -Zellen zeigt oszillierendes Verhalten (HENQUIN und MEISSNER 1984). Es erfolgt Depolarisation bis zu einem Schwellenwert um -40 mV. Ausgehend von diesem Schwellenwert werden Aktionspotentiale ausgelöst. Die durch die Depolarisation der Plasmamembran ausgelöste Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle (VDCC) vom L-Typ (HENQUIN und MEISSNER 1984), (MATTHEWS 1970), (RORSMAN et al. 1988) führt schließlich zum Anstieg der Calciumkonzentration in der Nähe der Cytoplasmamembran (AMMALA et al. 1994). Daneben wird die Beteiligung von R-Typ Kanälen von einigen Gruppen postuliert (YANG und BERGGREN 2005). Die gesteigerte Calciumkonzentration stellt für die  $\beta$ -Zellen ein Signal für die Ausschüttung von Insulin dar (MATTHEWS 1970), (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1 Die Stimulation der Insulinsekretion in einer pankreatischen β-Zelle.** Durch die Verstoffwechselung von Glucose kommt es zum Anstieg des ATP/ADP-Konzentrationsverhältnisses im Cytosol der β-Zelle. Dies führt zur Blockade des K<sub>ATP</sub>-Kanals. Die Folge ist die Depolarisation der Plasmamembran und die Öffnung spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle vom L-Typ. Die cytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration steigt durch den Einstrom extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Ionen an, was die Auslösung der Exozytose der Insulingranula zur Folge hat und damit die Freisetzung des Insulins aus der β-Zelle.

Dieser K<sub>ATP</sub>-Kanal-abhängige Effekt -oder auch „triggering pathway“- wurde Mitte der 80er Jahre als hinreichend empfunden und auch als Konsensushypothese bezeichnet. Der „triggering pathway“ bezeichnet den K<sub>ATP</sub>-Kanal als das Bindeglied zwischen dem Energiestoffwechsel und den Änderungen des Ionentransports in der β-Zellmembran (TRUBE et al. 1986), (DUNNE und PETERSEN 1991). Zusätzlich gibt es aber auch K<sub>ATP</sub>-Kanal-unabhängige Signale, die ebenfalls vom Energiestoffwechsel ausgehen. Nährstoffe wie Glucose, D-Glyceraldehyd und α-Ketoisocapronsäure erzeugen weitere Signale, die eine Verstärkung der Insulinsekretion bewirken (PANTEN et al. 1988), (GEMBAL et al. 1992), (STRAUB und SHARP 2002). Es konnte 1988 von der Arbeitsgruppe um Panten zum ersten Mal belegt werden, dass die Insulinsekretion bei Erhöhung der Glucosekonzentration über die allein durch Sulfonylharnstoffe ausgelöste Sekretionsrate hinaus gesteigert werden konnte, wenn der K<sub>ATP</sub>-Kanal durch maximal wirksame Sulfonylharnstoffkonzentrationen komplett blockiert war (PANTEN et al. 1988). Die Gruppe um Henquin beobachtete dann später, dass ein Glucose-induzierter Anstieg der Insulinsekretion trotz vollständiger Öffnung des K<sub>ATP</sub>-Kanals durch Diazoxid -bei

gleichzeitiger durch hohe extrazelluläre  $K^+$ -Konzentrationen induzierter Depolarisation der Plasmamembran- bewirkt werden konnte (GEMBAL *et al.* 1992), (SATO *et al.* 1992). Diese  $K^+$ -induzierte Insulinsekretion in Gegenwart von Diazoxid war deutlich abhängig von der Glucosekonzentration: bereits Konzentrationen im Bereich von 2 - 5 mM Glucose wirkten verstärkend (GEMBAL *et al.* 1992), (SATO und HENQUIN 1998).

Daher wird vom „triggering“ also auslösenden, und „amplifying“ also verstärkenden Signalweg gesprochen (HENQUIN 2000). Der „triggering pathway“ bezeichnet die Signalkaskade, die mit dem Schluss des  $K_{ATP}$ -Kanals beginnt, wohingegen der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängige Effekt, der „amplifying pathway“, dessen Wirkung verstärkt und optimiert (GEMBAL *et al.* 1992), (GEMBAL *et al.* 1993), (HENQUIN 2000), worin auch seine physiologische Bedeutung liegt (TAGUCHI *et al.* 1995), (SEGHERS *et al.* 2000). Der „amplifying pathway“ ist zurzeit in seinem Ablauf noch nicht vollständig charakterisiert. Seine Aufklärung wäre sehr bedeutsam, da dann Pharmaka entwickelt werden könnten, die selektiv Strukturen des verstärkenden Signalwegs angreifen und so beim Typ 2 Diabetes eingesetzt werden könnten ohne ein Hypoglykämierisiko zu besitzen, da sie die Insulinsekretion nur bei erhöhten Glucosekonzentrationen steigern würden.

#### **1.4. Imidazoline als Basis für die Entwicklung von glucoseselektiven insulinotropen Pharmaka**

Da das GLP-1-Analogon Exendin-4 nur parenteral verfügbar ist, und somit nur eine niedrige Compliance zu erwarten ist, bleibt es weiterhin von großer Wichtigkeit, Substanzen zu finden, die wie das GLP-1 die Insulinsekretion nur bei erhöhten Blutglucosewerten steigern und die dabei oral verfügbar sind. Einige Vertreter aus der Substanzklasse der Imidazoline scheinen das Potential für diese Entwicklung zu besitzen. RX871024 (ZAITSEV *et al.* 1996) und Efaroxan (CHAN und MORGAN 1990) steigern die Insulinsekretion glucoseselektiv und wirken damit -ähnlich wie GLP-1 und dessen Analoga- als Potentioren der Insulinsekretion. Die Entwicklung der Imidazoline als Substanzen mit insulinsekretionssteigernder Wirkung hat ihren Ursprung in der Beobachtung, dass das Imidazolin Phentolamin -ein unselektiver Adrenozeptor-Antagonist- die Blutglucosekonzentration zu senken vermag. Schulz und Hasselblatt zeigten dann, dass dieser Effekt, nicht wie zunächst angenommen auf eine  $\alpha_2$ -Rezeptorblockade zurückzuführen ist (ROBERTSON und PORTE 1973),

(AHREN und LUNDQUIST 1985), (BROADSTONE et al. 1987), sondern dass die Phentolamin-induzierte Insulinsekretionssteigerung ein spezifischer Effekt von Substanzen mit einer Imidazolinstruktur ist (SCHULZ und HASSELBLATT 1988), (SCHULZ und HASSELBLATT 1989a), (SCHULZ und HASSELBLATT 1989b). Daraufhin begann die Suche nach dem insulinsekretionssteigernden Wirkmechanismus der Imidazoline. Unabhängig von  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren konnten verschiedene Imidazolin-Rezeptoren, wie z.B.  $I_1$ -Rezeptoren im Hirnstamm, in der Niere und Thrombozyten verschiedener Spezies wie Mensch, Ratte und Meerschweinchen, sowie  $I_2$ -Rezeptoren in peripherem Gewebe und Hirngewebe von Säugern nachgewiesen werden (zur Übersicht s. (MOLDERINGS 1997)). Es erschien denkbar, dass auch die blutzuckersenkende Wirkung durch einen  $\beta$ -Zell-spezifischen Imidazolin-Rezeptor ( $I_3$ -Rezeptor) vermittelt wird. Es wurde gezeigt, dass Phentolamin durch eine  $K_{ATP}$ -Kanalblockade seine blutzuckersenkende Wirkung entfaltet (PLANT und HENQUIN 1990), (RUSTENBECK et al. 1997). Bindungsstudien zufolge konnte aber die Bindungsstelle von Phentolamin am  $K_{ATP}$ -Kanal nicht identisch sein mit derjenigen von Sulfonylharnstoffen (RUSTENBECK et al. 1999). Da die insulinsekretionssteigernden Effekte von Imidazolin nicht mit ihren Angriffsorten für  $I_1$ - und  $I_2$ -Rezeptoren korrelierten, wurde von der Arbeitsgruppe um Morgan die Existenz eines  $\beta$ -Zell-spezifischen  $I_3$ -Rezeptors postuliert (CHAN et al. 1993), (CHAN et al. 1994). Ob es sich bei diesem  $I_3$ -Rezeptor um einen membranständigen Rezeptor handelt, über den die Vielzahl von Effekten der Imidazoline in der  $\beta$ -Zelle -insbesondere auch der Schluss des  $K_{ATP}$ -Kanals- vermittelt werden, ist noch nicht geklärt. Allgemein wird argumentiert, dass für das Vorliegen einer rezeptorvermittelten Wirkung mit Signalkaskade folgende Kriterien erfüllt sein müssen: 1) Das Kriterium der Stereoselektivität besagt, dass sich die Stereoisomere eines Bindungsmoleküls an dessen Rezeptor in ihrer Wirksamkeit unterscheiden müssen, 2) die Langzeitexposition mit Agonisten, d.h. mit stimulatorisch wirksamen Substanzen, muss eine Desensibilisierung auslösen und 3) für den Rezeptor muss ein Antagonist identifiziert werden können. Die Arbeitsgruppe um Morgan und Chan konnte mit einigen Befunden die Vermutung unterstützen, dass diese drei Kriterien für die insulinsekretionssteigernde Wirkung der Imidazoline erfüllt sind (CHAN et al. 1993). Bezüglich Kriterium 1 konnte sie zeigen, dass die Stereoisomere des insulinsekretionssteigernden Imidazolins Efaroxan unterschiedlich starke Effekte



bewirkten: 1) Das (+)-Enantiomer des Efaroxans bewirkte im Vergleich zum (-)-Enantiomer eine stärkere Erhöhung der durch  $\alpha$ -Agonisten gehemmten Insulinsekretion. 2) Das (-)-Enantiomer des Efaroxans steigerte die durch Diazoxid gehemmte Insulinsekretion stärker als das (+)-Enantiomer in äquimolaren Konzentrationen, wobei diese Wirkung über Effekte auf  $K_{ATP}$ -Kanäle vermittelt wurde. 3) Die eigene insulinsekretionssteigernde Wirkung beider Stereoisomere unterschied sich deutlich: die steigernde Wirkung des (-)-Enantiomers des Efaroxans war in Gegenwart von 6 mM Glucose fast doppelt so stark ausgeprägt wie diejenige des (+)-Enantiomers. Allerdings stellte die Arbeitsgruppe um Henquin diese Auffassung ein Jahr später in Frage, indem sie zeigten, dass die beschriebene Stereoselektivität nur für die über  $\alpha$ -Adrenozeptoren vermittelten Wirkungen gilt, nicht aber für die  $K_{ATP}$ -Kanalblockade, die letztlich für die insulinsekretionssteigernde Wirkung der Imidazoline verantwortlich gemacht wird (JONAS et al. 1994). Schließlich berichtete die Arbeitsgruppe um F. Ashcroft, dass Phentolamin durch direkte Blockade der Ionenpore  $K_{ir}6.2$  den  $K_{ATP}$ -Kanal schließt (PROKS und ASHCROFT 1997). Als Konsequenz dessen wurde von der Gruppe um Morgan die Hypothese aufgestellt, dass der  $I_3$ -Rezeptor Teil der porenformenden  $K_{ATP}$ -Kanaluntereinheit  $K_{ir}6.2$  sein könnte (PROKS und ASHCROFT 1997), (MONKS et al. 1999).

Die Arbeitsgruppe von Chan beschrieb auch, dass stimulatorisch wirksame Imidazoline wie Phentolamin und Efaroxan im Gegensatz zu scheinbar unwirksamen Imidazolininen wie Idazoxan eine homologe Desensitisierung (CHAN *et al.* 1993) bewirkten. Unter einer homologen Desensitisierung versteht man das selektive Ausbleiben einer Reaktion auf Stimuli einer bestimmten Substanzklasse wie z.B. den Imidazolininen, während auf Stimuli einer anderen Substanzklasse wie z.B. den Sulfonylharnstoffen, eine unveränderte Reaktion erfolgt. Damit schien auch das zweite Kriterium für das Vorliegen einer rezeptorvermittelten Wirkung der Imidazoline erfüllt. Die Arbeitsgruppe um Rustenbeck (RUSTENBECK et al. 2001a), (RUSTENBECK et al. 2001b) fand jedoch, dass durch diverse Stimuli, die alle eine länger anhaltende Depolarisation bewirkten, eine Desensitisierung gegenüber der durch Imidazoline induzierten Steigerung der Insulinsekretion ausgelöst werden konnte. Außerdem konnten sie belegen, dass die mit Imidazolininen vorinkubierten Pankreasinseln auch gegenüber anderen durch Depolarisation insulinsekretionssteigernd wirkenden Stimuli wie Tolbutamid oder hohes extrazelluläres Kalium desensitisierten. Das heißt, dass diese Stimuli in mit

Imidazolinen vorbehandelten Inseln eine verminderte Steigerung der Insulinsekretion im Vergleich zur Kontrolle bewirkten. Ein wesentliches Argument für eine Rezeptor-vermittelte Wirkung von Imidazolinen war die Beobachtung der Gruppe um Morgan, dass effektive Imidazoline wie Efaroxan, nicht aber inaktive wie Idazoxan eine homologe Desensibilisierung auslösen (CHAN *et al.* 1993). Diese Beobachtungen lassen die Desensibilisierung eher als eine heterologe Desensibilisierung erscheinen.

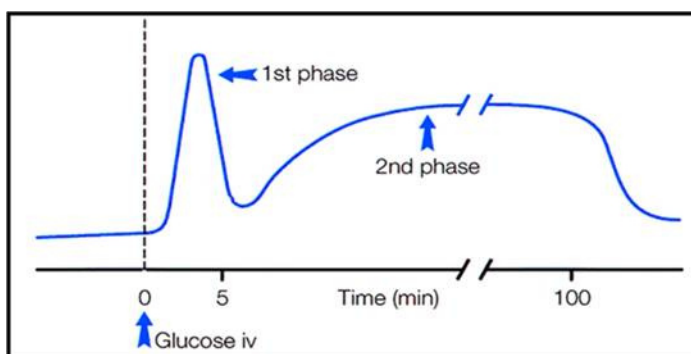
Die dritte Voraussetzung für eine rezeptorvermittelte Wirkung, d.h. die Identifizierung eines Antagonisten, erfolgte durch die Gruppe Morgan und Chan mit den Substanzen KU14R (CHAN *et al.* 1998) und RX801080 (CHAN *et al.* 1997). Die Substanz KU14R konnte als Antagonist der Efaroxan-induzierten insulinsekretionssteigernden Wirkung identifiziert werden (CHAN *et al.* 1998). KU14R unterscheidet sich von Efaroxan durch eine zusätzliche Doppelbindung, so dass ein Imidazolring an die Stelle des Imidazolinrings getreten ist. Der antagonistische Wirkmechanismus des KU14Rs soll darin bestehen, dass KU14R  $K_{ATP}$ -Kanäle, die durch Efaroxan geschlossen wurden, wieder öffnen kann (CHAN *et al.* 1998). Gleichzeitig wurde für KU14R aber eine eigene  $K_{ATP}$ -Kanal-blockierende Wirkung beschrieben. Die Arbeitsgruppen um McClenaghan und um Taberner zeigten, dass KU14R nicht antagonistisch sondern additiv zu Imidazolinen wirkt (BALL *et al.* 2000), (MAYER und TABERNER 2002). Somit wird deutlich, dass das Vorliegen der drei Kriterien für eine rezeptorvermittelte Wirkung der Insulinsekretionssteigerung durch Imidazoline umstritten ist. Es wird mittlerweile davon ausgegangen, dass mehrere voneinander unabhängige Effekte die insulinsekretionssteigernde Wirkung der Imidazoline induzieren. Beispielsweise haben Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Zaitsev ergeben, dass das Imidazolin RX871024 exozytotische Prozesse verstärken kann (ZAITSEV *et al.* 1996). Vermutlich wird das über einen Anstieg von Diacylglycerol (DAG), einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und der sich anschließenden Stimulierung der Proteinphosphorylierung (ZAITSEV *et al.* 1999), (EFENDIC *et al.* 2002) vermittelt. Zudem konnten Imidazoline wie BL11282 synthetisiert werden, die nicht in der Lage sind, den  $K_{ATP}$ -Kanal zu blockieren (EFANOV *et al.* 2001), aber ähnlich wie RX871024 und Efaroxan zu einer glucoseselektiven Stimulation der Insulinsekretion führen. Solche Imidazoline, die ihre Wirkung vermutlich ausschließlich über distale Effekte vermitteln, werden als Imidazoline der zweiten Generation bezeichnet (EFENDIC *et al.* 2002).

## 1.5. Perspektiven der Erforschung der Desensitisierung der Insulinsekretion

Aus der Pharmakotherapie ist bekannt, dass die Wirksamkeit eines Arzneistoffs bei kontinuierlicher oder wiederholter Anwendung nachlassen kann. Die Desensitisierung tritt typischerweise bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf (LOHSE 1993). Eine Desensitisierung findet sich auch in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Werden diese über einen langen Zeitraum einem sekretionssteigernden Stimulus ausgesetzt, so zeigen sie nach erneuter Exposition eine deutlich verminderte Sekretionsleistung. Dieser Zustand kann sowohl durch Nährstoffe als auch durch andere insulinsekretionssteigernde Stimuli, wie z.B.  $K_{ATP}$ -Kanal blockierende Substanzen, induziert werden, und diese können sowohl physiologischer als auch pharmakologischer Herkunft sein (RUSTENBECK 2002; RUSTENBECK *et al.* 2004b). Das deutet darauf hin, dass hier eine heterologe Desensitisierung vorliegt. Per Definition bezeichnet die Desensitisierung einen reversiblen Funktionszustand, der nicht von strukturellen Änderungen begleitet sein muss. Mitgeteilte Zeiträume für die Wiederherstellung der Sekretionsfähigkeit liegen zwischen fünf Minuten und mehreren Stunden (RUSTENBECK 2002; RUSTENBECK *et al.* 2004b). Davon abzugrenzen ist der Begriff der Glucose-Toxizität, bei der es auch zu einer verminderten Sekretionsleistung kommt, die aber einhergeht mit strukturellen Veränderungen der  $\beta$ -Zellen. Die Desensitisierung der Insulinsekretion ist über den oben (s. Kapitel 1.4) angeführten Bezug zur Imidazolin-induzierten Insulinsekretion von allgemeinem Interesse, da sie als initialer Schritt in einem Entwicklungskontinuum von  $\beta$ -Zell-Fehlfunktion über  $\beta$ -Zell-Erschöpfung bis hin zum  $\beta$ -Zell-Massenverlust aufgefasst werden kann (RUSTENBECK *et al.* 2004b). Der  $\beta$ -Zell-Massenverlust wird zunehmend als pathogenetischer Faktor für die Entstehung des Typ 2 Diabetes diskutiert (WEIR und BONNER-WEIR 2004), (BUTLER *et al.* 2003), (MEIER 2008). Auch könnte die Desensitisierung eine Rolle beim Sekundärversagen der Therapie mit oralen Antidiabetika spielen. Inwieweit ein kontinuierlicher  $\beta$ -Zell-Massenverlust zum Sekundärversagen beiträgt und durch sekretionssteigernde OAD sogar noch beschleunigt wird ist ebenfalls Gegenstand der Diskussion.

## 1.6. Exozytose der Insulin-Sekretgranula

In den oben (s. Kapitel 1.4) dargestellten Befunden zu den Wirkmechanismen der Imidazoline ergab sich eine Diskrepanz zwischen einer Imidazolin-induzierten Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration einerseits, und einer praktisch ausbleibenden Stimulation der Insulinsekretion andererseits. Diese Befundkonstellation stellte in dieser Weise ein konzeptionelles Problem dar, als nach den gegenwärtig weitgehend akzeptierten Auffassungen ein durch Depolarisation induzierter Calciumanstieg auch in Gegenwart von basaler Glucose für die Auslösung der ersten Phase hinreichend ist. Die erste Phase wurde, nach Befunden die zum größten Teil von der Gruppe um Rorsman beobachtet wurden, dadurch erklärt, dass eine Reihe von Sekretgranula (ca. 50 pro Zelle) in unmittelbarer Nähe der inneren Mündung der Calciumkanäle keines weiteren Signals für die Fusion mehr bedürfen als eben eine vorübergehende Erhöhung einer Calciumkonzentration in ihrer Umgebung. Der Rückgang der Sekretionsrate der ersten Phase ist in dieser Modellvorstellung auf die Entleerung dieses schnell verfügbaren Pools zurückzuführen, und der langsame Wiederanstieg der Sekretionsrate in der zweiten Phase auf dessen ATP-abhängige und deshalb langsame Wiederauffüllung (RORSMAN et al. 2000), (BARG et al. 2002a).

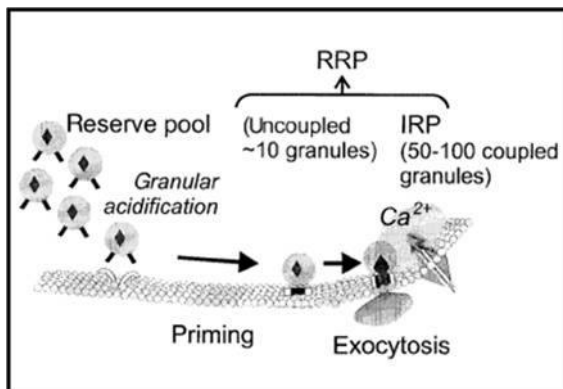


**Abb. 1.2 Biphasische Insulinsekretion.**

Die glucoseinduzierte Insulinsekretion ist charakterisiert durch eine schnelle erste Phase und eine langsamere zweite Phase der Insulinausschüttung. Abbildung adaptiert von K. JUHL and J. HUTTON, *Advances in experimental medicine and biology* 552, 66-90, 2004

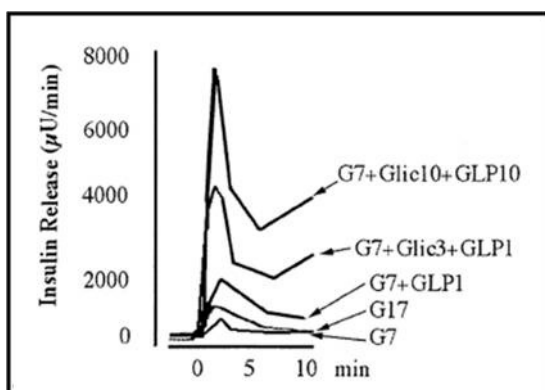
Nach dem Öffnen der Calciumkanäle in der Plasmamembran und dem Einstrom von Calcium in die Zelle beginnt die Exozytose nach weniger als 50 ms. Diese Zeitverzögerung ist kürzer als die Zeit, die Calciumionen brauchen, um sich im Cytosol zu verteilen. Man geht daher davon aus, dass die Sekretgranula in der Nähe der Calciumkanäle lokalisiert sind, und dadurch die Abhängigkeit von Änderungen der cytosolischen Calciumkonzentrationen bedingt ist. Es wurden auch tatsächlich Regionen mit einer hohen Dichte an Calciumkanälen gefunden, die mit Sekretgranula co-lokalisiert sind. Diese werden als „hot Spots“ der Sekretion

bezeichnet (BOKVIST et al. 1995). Eine  $\beta$ -Zelle der Maus enthält ca. 9000 (OLOFSSON et al. 2002) - 13000 Sekretgranula (DEAN 1973). Nur der ganz kleine Teil von 50-75 Granula (ELIASSON et al. 1997) bildet jedoch den sogenannten readily releasable pool (RRP), der für die unmittelbare Insulinausschüttung verfügbar ist (RORSMAN et al. 2000), (GROMADA et al. 1999). Die übrigen Sekretvesikel bilden den sogenannten reserve pool, aus dem sie durch priming in den RRP übergehen können, um dann erneut für die Exozytose bereit zu stehen (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3 Modell für die biphasische Insulinsekretion der  $\beta$ -Zelle.** Die schnelle Freisetzung des RRP (ca. 50 Granula) entspricht der ersten Phase der Insulinsekretion. Abbildung Adaptiert von S. BARG et al, Diabetes 51, S 74-82, 2002

Diese Modellvorstellung kann jedoch nicht erklären warum es möglich ist, die erste Phase durch Kombination von depolarisierenden und verstärkenden Stimuli (Glucose + Sulfonylharnstoff + GLP-1) um ein Mehrfaches zu erhöhen, ohne dabei die Kinetik der Freisetzung zu verzerren, wie es von Nesher und Cerasi in mehreren Publikationen beschrieben wurde (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4 Erste Phase der Insulinsekretion im perifundierten Ratten-Pankreas.** Das Ausmaß der ersten Phase der Insulinsekretion lässt sich durch Kombination von Glucose, Glicazid und GLP-1 erhöhen. Abbildung Adaptiert von R. NESHER and E. CERASI, Diabetes 51, S 53-59, 2002

Diese Autoren vertreten die Ansicht, dass die Biphasizität der Insulinsekretion nicht durch fest definierte Granulapools bestimmt ist, sondern durch eine Abfolge von stimulierenden und inhibierenden Signalen, die aus der Verstoffwechselung der Glucose in der  $\beta$ -Zelle entstehen (NESHER und CERASI 2002).

In diesem Zusammenhang sind die Befunde der Gruppe um Chow bemerkenswert, die in einem der  $\beta$ -Zelle ähnlichem sekretorischen Zelltyp, der chromaffinen Zelle, gefunden hatte, dass die neusynthetisierten Granula bevorzugt freigesetzt werden, was im Widerspruch zu der oben dargestellten Auffassung einer kontinuierlichen Ausreifung der Granula und Füllung der sekretorischen Pools steht (DUNCAN et al. 2003). Insofern können trotz der Vielzahl der gegenwärtig existierenden Detailbefunde noch wesentliche Änderungen in den Konzepten der  $\beta$ -Zell-Exozytose möglich sein.

## 2. Ziele der Arbeit

Die Stimulus-Sekretions-Kopplung in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas beruht auf der elektrischen Erregbarkeit und der dadurch getriggerten calciumabhängigen Exozytose. Es ist jedoch offensichtlich, dass weitere Signale vom aktivierten Energiestoffwechsel der  $\beta$ -Zelle ausgehen, die die Effektivität der calciumabhängigen Exozytose steigern (amplifizierende Signale). Um den Mechanismus besser zu verstehen bedarf es der Darstellung der membrannahen Sekretgranula, da deren Zahl und Funktionszustand bestimmt, in welchem Ausmaß ein depolarisations-induzierter Calciumeinstrom eine exozytotische Antwort hervorbringen kann.

Es sollte daher in dieser Arbeit eine Methode zur selektiven Fluoreszenzmarkierung von Insulin-Sekretgranula etabliert werden, die eine flexible Kombination mit anderen Fluoreszenzindikatoren zulässt. Daher war die Herstellung eines fluoreszierenden Fusionsproteins aus einem typischen Protein von Insulin-Sekretgranula und einem fluoreszierenden Protein die naheliegende Lösung. Diese Fluoreszenzmarkierung sollte nicht nur in insulinproduzierenden Zelllinien (RINm5F, INS1-E, MIN6) verwendbar sein, sondern auch in primären  $\beta$ -Zellen, wofür geeignete Vektoren erprobt werden sollten. Die Verwendbarkeit der Fluoreszenzmarkierung sollte dann durch Charakterisierung des Sekretionsverhaltens der transfizierten Zellen beurteilt werden. Insbesondere war die Charakterisierung der Desensitisierung der Insulinsekretion durch längerdauerndes Einwirken eines Depolarisationsstimulus von Interesse, da hier die Frage zu beantworten ist, wieweit die Desensitisierung durch Änderung in der Signaltransduktion oder durch einen Mangel an sekretionsfähigen Granula bedingt ist. Ein verwendungsfähiger Label sollte es schließlich ermöglichen, die Exozytose von einzelnen membrannahen Insulin-Sekretgranula mittels TIRF-Mikroskopie in Echtzeit zu beobachten.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Biochemikalien und Zellkulturreagenzien

<b>2-Mercaptoethanol</b>	<b>Fluka, Buchs, Schweiz</b>
30% Acryl-/Bisacrylamid Mix (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth, Karlsruhe
Accutase	PAA, Cölbe
Adenosindiphosphat (ADP), Monokaliumsalz	Sigma, Taufkirchen
Adenosintriphosphat (ATP), Dinatriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Agarose, low melting-Qualität	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ampicillin-Natrium	Carl Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Carl Roth, Karlsruhe
Bakto-Tryptone	Carl Roth, Karlsruhe
Bakto-Yeast-Extrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Bernsteinsäure	Fluka, Buchs, Schweiz
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
CCCP (Carbonylcyanid 3-chlorophenylhydrazon)	Sigma, Taufkirchen
Chloroquin	Sigma, Taufkirchen
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R 250	Merck, Darmstadt
D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Diethylether	Carl Roth, Karlsruhe
Digitonin	Sigma, Taufkirchen
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DMEM (high glucose), Pulvermedium	Biochrom, Berlin
DMEM (low glucose), Flüssigmedium	PAA, Cölbe
DMEM (w/o glucose), Flüssigmedium	PAA, Cölbe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth, Karlsruhe
dNTP-Mix (10mM)	Genecraft, Lüdinghausen
DTT (Dithiothreitol)	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe



Efaroxan	Tocris Bioscience, Ellisville, USA
EGTA (Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Sigma, Taufkirchen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FBS) Gold	PAA, Cölbe
Fura-2/AM	MoBiTec, Göttingen
Fura-PE3/AM	MoBiTec, Göttingen
G418-Sulfat (Geneticin)	PAA, Cölbe
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Glycogen	Boehringer, Mannheim
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol (UV/IR-grade)	Carl Roth, Karlsruhe
JetPei Transfektionreagenz	Polyplus-Transfection, Illkirch Cedex, Frankreich
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Kollagen Typ 1	Sigma, Taufkirchen
Kollagenase (Collagenase P)	Boehringer, Mannheim
Lysozym	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver (blotting grade)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumbutyrat	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Oligonukleotide (Auftragssynthese)	biomers.net, Ulm
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe
Phosphoenolpyruvat	Sigma, Taufkirchen
Polybrene (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Taufkirchen

Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
Pyruvatkinase TypIII aus dem Kaninchenmuskel	Sigma, Taufkirchen
Rhodamin123	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Rinderalbumin (BSA) Fraktion V	Miles Diagnostics, Illinois, USA
RINm5F-Zellen	ATTC, Rockville, USA
RPMI- 1640 Pulvermedium 10mM Glucose	Biochrom, Berlin
RPMI- 1640 Pulvermedium ohne Glucose	Biochrom, Berlin
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
TEA (Triethanolamin)	Sigma, Taufkirchen
TEMED (N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin)	Carl Roth, Karlsruhe
Tolbutamid	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol) -HCl	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin / EDTA	PAA, Cölbe
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurate)	Sigma, Taufkirchen

### **Enzyme**

CIAP (alkalische Phosphatase)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Mid Range PCR System	peqlab, Erlangen
Restriktions-Endonucleasen	Fermentas, St. Leon-Rot
Sawady Pwo DNA-Polymerase	peqlab, Erlangen
Sawady Taq-Polymerase	peqlab, Erlangen
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot

### **Kits und Marker**

1 kb DNA-Längenstandard Gene Ruler	Fermentas, St. Leon-Rot
Adenosintriphosphat (ATP) Biolumineszent Assay Kit	Sigma, Taufkirchen
Invisorb Spin PCRapid Kit	Invitex, Berlin
Ladepuffer 6x Orange Loading Dye Solution	Fermentas, St. Leon-Rot
NucleoBond PC-100 Midi Prep Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond PC-500 Maxi Prep Kit	Macherey-Nagel, Düren
Protein-Marker peqGold prestained IV	peqlab, Erlangen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

<b><u>Bakterienstämme</u></b>	
<i>E. coli</i> JM107	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>E. coli</i> SURE-strain	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> XL1Blue	Stratagene, La Jolla, USA

<b><u>Vektoren</u></b>	
pAlter-1	Promega, Mannheim
pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe
pEGFP-N1	BD Clontech, Heidelberg
pTimer	BD Clontech, Heidelberg

Wenn nicht anders angegeben wurden Chemikalien vom Reinheitsgrad „pro analysi“ (p.a.) oder „für die Molekularbiologie“ verwendet.

Für die Herstellung der Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, Wasser aus einer Reinstwasser-Anlage (Ultra Clear UV, SG, Barsbüttel) verwendet.

Sterile Zellkulturgefäße und Plastiklaborartikel wurden von den Herstellern Sarstedt, Biozym, Eppendorf, Greiner und Nunc bezogen.

Zur Datenverarbeitung wurde folgende Software verwendet:

Microsoft Word 2007

Microsoft Excel 2007

Adobe Photoshop 7

Graph Pad Prism 3.02 (Graph Pad, San Diego, California)

EndNote X.0.2

MetaMorph V 7.0 (Molecular Devices)

AutoDeblur 2D X1.4.0 (AutoQuant Imaging, New York)

## 3.2. Zellkultur

### 3.2.1. Sterilisierung von verwendeten Materialien und Lösungen

Kulturmedien, Puffer und Kunststoffartikel wurden, sofern es die chemische Zusammensetzung zuließ, durch Autoklavierung (20 Minuten bei 121 °C) sterilisiert. Bei hitzeempfindlichen Substanzen wurde die Lösung durch einen 0.22 µm-Filter (je nach zu filtrierendem Volumen entweder Einweg-Druckfiltrationseinheit Sartolab-P oder Spritzenvorfilter, beides Sartorius, Göttingen) sterilfiltriert. Glasgeräte wurden 30 Minuten bei 180 °C hitzesterilisiert.

### 3.2.2. Verwendete Lösungen

#### DMEM-Medien

Für die Kultivierung der MIN6 Zellen wurde DMEM-Medium verwendet. Das Medium für die Erhaltungskultur enthielt 25 mM Glucose. DMEM-Pulvermedium (25 mM Glucose) wurde zusammen mit NaHCO<sub>3</sub> in Wasser gelöst. Nach Zugabe von Penicillin (10 U/ml) und Streptomycin (10 µg/ml), pH-Einstellung auf 7,2 und Sterilfiltration wurde das Medium in Einzelportionen zu 400ml abgefüllt und bei 4 °C gelagert. Vor Gebrauch wurden dem Medium 10% fötales Kälberserum (FBS) und 50 µM 2-Mercaptoethanol zugesetzt.

Für die Durchführung der meisten funktionellen Untersuchungen wurde DMEM-Medium unterschiedlicher Glucose-Konzentrationen benötigt. Dafür wurde fertiges DMEM-Flüssigmedium ohne Glucose verwendet, dem vor Gebrauch neben den o.a. Zusätzen noch sterile Glucose-Lösung zugesetzt wurde. Auf diese Weise konnten die Glucose-Konzentrationen von 3, 15 und 30 mM eingestellt werden.

#### Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7,4):

8,00 g NaCl, 0,20 g KCl und 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O wurden in destilliertem Wasser gelöst und anschließend durch Autoklavieren sterilisiert

#### G418-Lösung (25 mg/ml)

1g G418-Sulfat wurde in 40 ml PBS gelöst und sterilfiltriert

### Accutase-Lösung

Accutase-Lösung wird gebrauchsfertig von der Firma PAA angeboten. Sie wurde anstelle von Trypsin-EDTA zum Ablösen der adhärenen Zellen verwendet. Accutase ist eine Mischung proteolytischer und kollagenolytischer Enzyme, die auch bei längerer Einwirkzeit keine so stark ausgeprägte zellschädigende Wirkung hat wie Trypsin-EDTA.

### Trypan-Blau-Lösung (0,4%)

0,4 g Trypan-Blau wurden 100 ml 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung gelöst

### Kollagenlösung zur Beschichtung von Deckgläsern

Zur Kultivierung von MIN6-Zellen auf Deckgläsern (Ø 25 mm; Stärke 0,13 bis 0,17 mm, Fa. Menzel, Braunschweig) wurden diese mit Kollagen beschichtet. Für die Herstellung von 2 ml Kollagenlösung wurden 1 mg Kollagen vom Typ 1 in einem sterilisierten Schraubdeckelgefäß abgewogen und in einer 0,2%igen Essigsäure, welche direkt vor Zugabe steriltfiltriert wurde (LENZEN et al. 2000), im Ultraschallbad gelöst. Die fertige Lösung wurde bei 4°C gelagert und konnte in einem Zeitraum von vier Wochen verwendet werden.

Zur Beschichtung der Deckgläschen wurde 1 µl der sterilen Kollagenlösung unter einer Reinraumwerkbank gleichmäßig in der Mitte eines Deckgläschens verteilt (LENZEN und PECKMANN 2001) und für 10 Minuten zum Trocknen unter der Werkbank belassen.

## **3.2.3. Zellpassagierung und Erhaltungskultur von MIN6-Zellen**

Die Zellen wurden zur Erhaltung in 10 cm Petrischälchen gehalten. Eine Passagierung der Zellen erfolgte wöchentlich. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS überspült. Der Zellrasen wurde danach mit 3 ml Accutase-Lösung überschichtet und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert.

Das Ablösen der Zellen wurde durch leichtes Klopfen unterstützt, die Zellsuspension in 5 ml DMEM-Medium aufgenommen und in ein steriles 10 ml Schraubdeckelröhrchen überführt, in dem die Zellen durch 5minütiges Zentrifugieren bei 300 x g pelletiert wurden. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in DMEM-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden für die Aussaat wie in

Abschnitt 3.2.4 beschrieben gezählt. Für die Erhaltungskultur wurden  $10^6$  Zellen pro 10 cm Petrischälchen ausgesät. Für die Versuchsreihen in unterschiedlich großen Zellkulturgefäßen wurde die Anzahl der auszusäenden Zellen entsprechend angepasst.

#### **3.2.4. Bestimmung der Zellzahl mittels Hämocytometer**

Die Anzahl der Zellen bzw. deren Konzentration in einer Suspension wurde mit Hilfe eines Hämocytometers (Neubauer Zählkammer) bestimmt. Dabei werden die Zellen unter dem Mikroskop in einem definierten Volumen gezählt. Auf der Neubauer-Zählkammer finden sich 9 Quadrate. Jedes Quadrat hat eine Fläche von  $1 \text{ mm}^2$ ; dies ergibt bei einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1  $\mu\text{l}$ . Die Multiplikation des Mittelwerts mit 10000 ergibt die Zellkonzentration pro Milliliter. Die Gesamtzellzahl ergibt sich nun aus dem Volumen der Zellsuspension multipliziert mit der Zellzahl pro Milliliter (LINDL 2002).

#### **3.2.5. Kryokonservierung und Auftauen von eingefrorenen MIN6-Zellen**

Die Zellen wurden in einer Gewebekulturschale bis zur Konfluenz kultiviert und wie in Abschnitt 3.2.3 bei der Passagierung beschrieben gewaschen, abgelöst und zentrifugiert. Die Resuspendierung erfolgte im Anschluss jedoch in auf  $4^\circ\text{C}$  vorgekühltem DMEM-Medium, dem 20% (v/v) FBS und 10% (v/v) DMSO zugesetzt wurde. Anschließend wurden je 1,8 ml der Zellsuspension (entsprechen  $2 \times 10^6$  MIN6-Zellen) in Kryoröhrchen (Sarstedt) aliquotiert. Die Röhrchen wurden in eine mit 100%igen Isopropanol gefüllte Einfrierbox (Mr. Frosty, Nalgene) gestellt, und nach einer Equilibrierzeit von ca. 30 Minuten für mindestens vier Stunden bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert. Danach wurden sie in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff ( $-196^\circ\text{C}$ ) für die Langzeitlagerung überführt.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im vorgewärmten Wasserbad ( $37^\circ\text{C}$ ) innerhalb einer Minute aufgetaut. An einem Aliquot von 50  $\mu\text{l}$  wurde die Vitalitätsprüfung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 mit Trypan-Blau-Lösung versetzt und in der Zählkammer die Zahl der lebenden (ungefärbten) Zellen bestimmt. Lag der Anteil der lebenden Zellen bei über

80% wurden die restlichen Zellen in ein 10 ml Schraubdeckelröhrchen überführt und mit 10 ml DMEM-Medium aufgefüllt. Nach anschließender Zentrifugation (fünf Minuten bei 300 x g) wurde der DMSO-haltige Überstand abgesaugt, das Zellpellet durch Zugabe von frischem Medium vorsichtig resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt. Bei stabil transfizierten Zelllinien wurde dabei dem Medium G418 als Antibiotikum zugesetzt (480µl G418-Lösung auf 10 ml Medium, das entspricht einer Endkonzentration von 1,2 mg/ml).

### 3.2.6. Insulinproduzierende Zelllinie MIN6

Bei MIN6-Zellen handelt es sich um eine von Insulinomen transgener Mäuse abgeleitete Zelllinie. Der Name MIN6 steht für „Mouse Insulinoma, 6. Subklon“. Durch die Kopplung der large T Antigen kodierenden Region des Simian Virus 40 (SV 40) mit dem humanen Insulinpromotor, der nur in den  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln aktiv ist, wurde eine "targeted expression" des Onkogens erreicht, wodurch die Tumorbildung auf die genannten Zellen beschränkt blieb. Im Gegensatz zu anderen  $\beta$ -Zelllinien, die häufig eine eingeschränkte Glucoseempfindlichkeit aufweisen, reagieren die MIN6-Zellen in einem Bereich von 0,7 mM – 25 mM Glucose mit einer konzentrationsabhängigen Insulinfreisetzung (MIYAZAKI et al. 1990). Die *in vivo* immortalisierten pankreatischen  $\beta$ -Zellen stellen ein Hilfsmittel zur Untersuchung der Mechanismen der Insulinsekretion dar, da sie die physiologische Effektivität der  $\beta$ -Zelle relativ gut widerspiegeln (ISHIHARA et al. 1993).

Zum Zweck der Bevorratung waren die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C tiefgefroren. Um die Versuche durchzuführen wurden die Zellen aufgetaut und weiter kultiviert, wobei die Versuche an den Zellpassagen 40 bis 55 erfolgten.

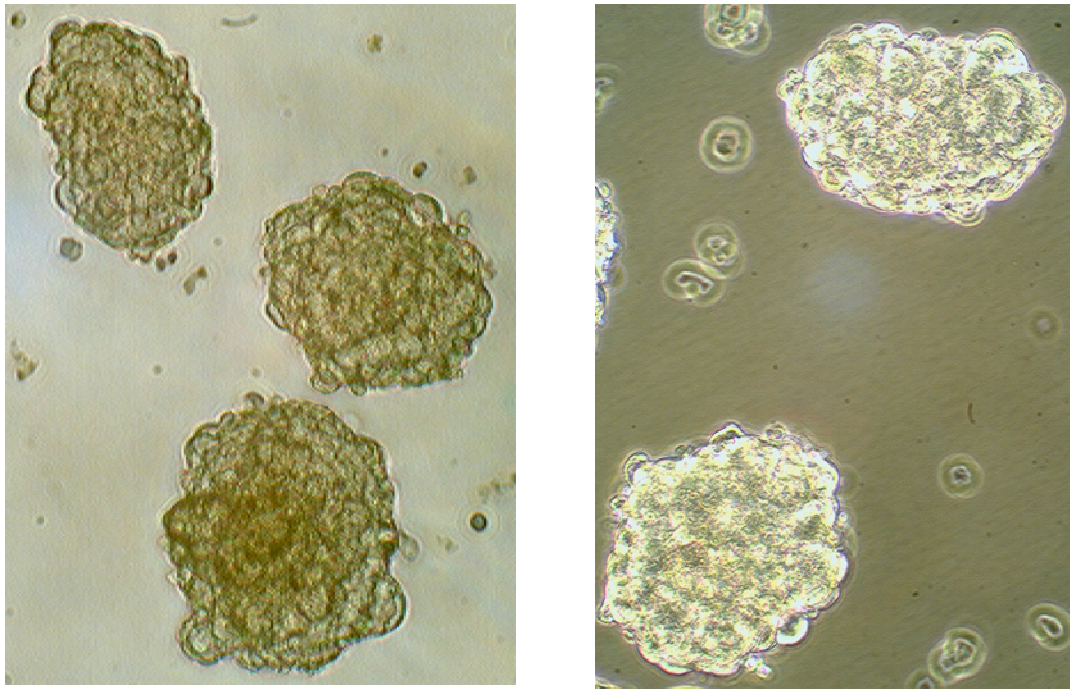
MIN6-Zellen wachsen als Monolayer-Kultur. Das Medium wurde jeweils nach 72 Stunden erneuert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Gewebekulturschrank. Die Passagierung der Zellen erfolgte wöchentlich. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank durchgeführt. Als Kulturgefäße wurden sterile Einwegprodukte verwendet.

### 3.2.7. MIN6-Pseudoinseln

Die Gruppe um Hauge-Evans (HAUGE-EVANS et al. 1999) fanden, dass sich MIN6-Zellen zu kugelförmigen Zellaggregaten zusammenschließen, wenn sie auf einer Gelatine-Schicht kultiviert werden. Die Arbeitsgruppe bezeichnete diese Zellhaufen als MIN6-Pseudoinseln. Für die MIN6-Pseudoinseln konnte gezeigt werden, dass sie deutlich besser auf einen physiologischen und auch pharmakologischen Stimulus ansprechen als Einzelzellen. Zudem blieb die Glucose-induzierte Insulinfreisetzung auch in hohen Passagen, im Gegensatz zu Einzelzellen, erhalten (HAUGE-EVANS et al. 1999). Von großer praktischer Bedeutung ist auch, dass die Insulinsekretionskinetik dieser Zellhaufen, ebenso wie die von Langerhans'schen Inseln, in Perifusionsversuchen untersucht werden kann. Das wichtigste Kriterium aus Sicht der Insulinfreisetzungskinetik ist aber die durch Glucose induzierte biphasische Insulinsekretion der MIN6-Pseudoinseln, die dem Sekretionsprofil der Langerhans'schen Inseln nahe kommt (HAUGE-EVANS et al. 2002).

Für die Herstellung der MIN6-Pseudoinseln wurden  $10^6$  MIN6-Zellen in 10ml DMEM aufgenommen und in eine unbeschichtete 10cm Petrischale für Suspensionskulturen (Sarstedt) überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Gewebekulturschrank. Durch die Verwendung von Suspensionskulturschalen, die aufgrund ihrer unbehandelten Oberfläche keine Zelladhäsion zulassen, wurde den Zellen die Möglichkeit genommen, als Monolayer zu wachsen. Dadurch verblieben die Zellmembranen als einzige zur Adhäsion geeignete Oberfläche. In der Folge entstanden aufgrund dessen nichtadhärente, kugelförmige Zellhaufen - Pseudoinseln (Abb. 3.1). Ein Wechsel des Mediums erfolgte einmalig nach vier Tagen, die Versuche wurden nach einer Wachstumszeit von acht Tagen durchgeführt.





**Abb. 3.1 MIN6-Pseudoinseln.** MIN6-Zellen, die üblicherweise als Monolayer wachsen, bilden wenn sie in Suspensionskulturschälchen kultiviert werden, kugelförmige Zellaggregate, die den primären Pankreas-Inseln funktionell ähnlich sind. Abgebildet sind Pseudoinseln nach acht Tagen Wachstumszeit (links DIC-Kontrast, 63x, rechts Dunkelfeld, 80x), mit einem typischen Durchmesser von ca. 250  $\mu\text{M}$ .

### 3.2.8. Insulinproduzierende Zelllinie RINm5F

Der Gruppe um Gazdar gelang es (GAZDAR et al. 1980), durch hochdosierte Ganzkörper-Röntgenstrahlung von *NEDH*-Ratten (*New England Deaconess Hospital*), einen transplantierbaren Inselzelltumor zu induzieren. Durch serielle Transplantationen in *NEDH*-Ratten und in immundefiziente thymuslose Mäuse wurden die Tumoren aufrechterhalten. Nach Ex-plantation konnten Tumorzellen *in vitro* kultiviert und so die kontinuierlichen Gewebekultur-Zellen RINm und RINr etabliert werden. Die RINm-Zelllinie wurde durch Bhathena et al. (BHATHENA et al. 1982) und Oie et al. (OIE et al. 1983) subkloniert. Die auf diese Weise gewonnenen Klone wurden in drei Gruppen eingeordnet: Insulinsezernierende Zellen, somatostatinsezernierende Zellen, und solche ohne Hormonsekretion. Der Subklon RINm5F zeigte eine stabile Insulinsekretion, jedoch keine nennenswerte Somatostatinfreisetzung.

Der bedeutendste Unterschied von RINm5F-Zellen zur pankreatischen  $\beta$ -Zelle besteht in der fehlenden physiologischen Glucose-induzierten Insulinsekretion (HALBAN et al. 1983) (PRAZ et al. 1983). Hauptursache hierfür ist das niedrige Glucokinase/Hexokinase-Verhältnis (LENZEN und TIEDGE 1994), durch das es nicht möglich ist, durch millimolare Glucosekonzentrationen den Metabolismus zu steigern. Wegen ihres robusten Wachstumsverhaltens ist diese Zelllinie populär geworden. Der Einsatz ist dann gerechtfertigt wenn genau definierte molekulare Mechanismen betrachtet werden sollen (z.B. Wirkung eines Pharmakons auf den  $K_{ATP}$ -Kanal).

### 3.2.9. Insulinproduzierende Zelllinie INS1-E

Aus einer Hybridkultur von Lymphozyten und der RIN-Linie (s. Kapitel 3.2.8) ist die INS1-Zelllinie hervorgegangen. Die INS1-Zellen reagieren im physiologischen Bereich von 5 bis 15 mmol/l Glucose mit einer Insulinsekretion (ASFARI et al. 1992), diese ist aber gegenüber der Basalsekretion weniger stark erhöht als in primären  $\beta$ -Zellen. Der Insulingehalt liegt bei etwa 20% des Wertes nativer  $\beta$ -Zellen. Darüber hinaus wurde mittels Immunfluoreszenz ausschließlich Insulin in INS1-Zellen detektiert. Glucagon, Somatostatin oder das Pankreatische Polypeptid (PP) konnten nicht nachgewiesen werden (ASFARI et al. 1992). Dies belegt den erhaltenen, hohen Differenzierungsgrad. Weiterhin blieb die Proliferation der INS1-Zelllinie über zwei Jahre hinweg stabil ohne Veränderung ihrer Merkmale (ASFARI et al. 1992). Zum kontinuierlichen Wachstum benötigen die Zellen 2-Mercaptoethanol in einer Konzentration von 50  $\mu$ mol/l im Medium (ASFARI et al. 1992). Die Gruppe um Janjic (JANJIC et al. 1999) isolierte 1999 zwei Subklone, INS1-E und INS1-D, die im Vergleich zur mütterlichen INS1-Zelllinie eine erhöhte Insulinsekretionsrate im Bereich von 5-20 mM Glucose aufweisen.

### 3.3. Isolierung von Langerhans'schen Inseln, Einzelzellgewinnung und Primärkultur

#### 3.3.1. Verwendete Lösungen

##### Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer

Als Basismedium für die Isolierung der Langerhans'schen Inseln wie auch für die funktionellen Untersuchungen wurde ein modifizierter Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer verwendet. Um eine Alkalisierung des Puffers durch Entweichen von CO<sub>2</sub> zu vermeiden, wurde zur Stabilisierung des pH-Wertes von 7,4 ein Teil des Bicarbonats durch den nicht flüchtigen organischen HEPES-Puffer ersetzt (LERNMARK 1974). Für die täglich frische Herstellung des Basismediums wurden Stammlösungen verwendet, die für ca. zwei Wochen bei 4 °C gelagert werden konnten.

Zur Oxygenierung und pH-Äquilibration wurde der Krebs-Ringer-Puffer nach der Herstellung 30 Minuten mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid) begast.

Stammlösungen zur Herstellung von Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer:

		<u>Volumen (ml)</u>	<u>Endkonzentration (mM)</u>
Stammlösung 1:	0,9% NaCl	80	115
Stammlösung 2:	1,15% KCl	3,2	4,7
Stammlösung 3:	1,62% CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	2,4	2,56
Stammlösung 4:	2,11% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,8	1,2
Stammlösung 5:	3,82% MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,8	1,2
Stammlösung 6:	1,3% NaHCO <sub>3</sub>	13,6	20
Stammlösung 7:	HEPES-Albumin-Lösung	<u>3,2</u>	10
		104	
	Albumin		0,2%

Für die Stammlösung 7 (7,74% HEPES + 6,5% Albumin) wurden 32,5 g Fettsäure-freies Rinderserumalbumin in 200 ml Wasser gelöst. Anschließend wurden 38,7 mg HEPES in 125 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert dieser Lösung wurde durch Zugabe von 60 - 70 ml 1 N-NaOH auf 7,4 eingestellt. Nach Überführen der beiden Lösungen

in einen 500 ml Messkolben wurde das Volumen mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde in 10 ml-Portionen bei -20 °C gelagert.

Für die Durchführung von Perfusionen zur Bestimmung der Insulinsekretionsrate erfolgte zur Vermeidung von Schaumbildung in den Perfusionsschläuchen die Begasung mit Carbogen vor Zugabe der Stammlösung 7.

Zur Herstellung des Basismediums für die Fluoreszenzmikroskopie wurde die Stammlösung 7 als reine HEPES-Lösung ohne Albumin eingesetzt, um mögliche Schaumbildung in den Schlauchsystemen und in den Umströmungskammern während der Perfusion zu vermeiden. Um eine ausreichende Oxygenierung zu gewährleisten wurde hier der Puffer während des gesamten Experiments mit Carbogen begast.

#### Calciumfreie Lösung zur Gewinnung von Einzelzellen aus Langerhans'schen Inseln

Diese Lösung entsprach in den meisten Komponenten der oben genannten Krebs-Ringer-Lösung, die  $\text{CaCl}_2$ -haltige Stammlösung wurde durch EGTA-Lösung ersetzt, und ein größeres Volumen der HEPES-Albumin-Lösung zugesetzt. Es resultierten folgende Endkonzentrationen:

25mM	HEPES
0,5mM	EGTA
4,8mM	KCl
1,2mM	$\text{KH}_2\text{PO}_4$
1,2mM	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
135mM	NaCl
3mM	D-Glucose-Monohydrat
1%	Albumin

Die Substanzen wurden Wasser gelöst und die Lösung mit 1N NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Der gesamte Ansatz wurde sterilfiltriert und in Einzelvolumina zu je 5ml abgefüllt. Diese wurden bei 4 °C aufbewahrt.

#### RPMI-Medien für die Gewebekultur

Für die ersten drei Stunden der Primärkultur der isolierten Inseln und Einzelzellen wurde RPMI 1640-Medium mit 10mM Glucose verwendet. Bei dieser Glucose-

Konzentration wurde gegenüber 5 mM Glucose ein besseres Anwachsen der Inseln und Einzelzellen auf dem Deckgläschen beobachtet.

RPMI 1640-Pulvermedium (10 mM Glucose) wurde zusammen mit  $\text{NaHCO}_3$  in Wasser gelöst. Nach Zugabe von Penicillin (10 U/ml) und Streptomycin (10  $\mu\text{g/ml}$ ), pH-Einstellung auf 7,2 und Sterilfiltration wurde das Medium in Einzelportionen zu 90 ml abgefüllt und bei 4 °C gelagert.

Vor Gebrauch wurde den Einzelportionen 10% fötales Kälberserum (FBS) zugesetzt. Nach drei Stunden wurde das Petrischälchen mit den isolierten Inseln mit RPMI 1640-Medium mit 5mM Glucose aufgefüllt. Diese Glucosekonzentration bewirkt keine Stimulation der Insulinsekretion pankreatischer Inseln bzw.  $\beta$ -Zellen der Maus.

Die Herstellung dieses Mediums erfolgte analog desjenigen mit 10mM Glucose. Es wurde lediglich RPMI Pulvermedium ohne Glucose verwendet und dem Ansatz 991mg D-Glucose-Monohydrat pro Liter zugesetzt.

### **3.3.2. Isolierung der Langerhans'schen Inseln und anschließende Einzelzellgewinnung**

Die Langerhans'schen Inseln wurden durch Kollagenase-Andauung des isolierten Pankreas gewonnen (MOSKALEWSKI 1965). Es wurden Modifikationen verschiedener beschriebener Techniken (LACY und KOSTIANOVSKY 1967), (LERNMARK 1974) angewendet. Nach Dekapitation der Maus wurde das Fell im Abdominalbereich mit Ethanol desinfiziert und von der Subkutis getrennt. Anschließend wurde die Bauchhöhle geöffnet, das Pankreas vollständig entnommen, in 3 ml Krebs-Ringer-Lösung überführt und von eventuell anhaftendem Fettgewebe befreit. Danach wurde das Pankreas in 2 ml Krebs-Ringer-Lösung zwei Minuten lang mit einer Schere zerkleinert. Die Suspension mit den Gewebeschnittstücken wurde zu 1 mg Kollagenase in ein Glas-Schraubdeckelgefäß pipettiert und bei 37 °C im Schüttelwasserbad bei einer Frequenz von 328 rpm für 7 bis 8 Minuten inkubiert. Die Aktivitäten verschiedener Kollagenase-Chargen können variieren, so dass die Inkubationszeit bei Chargenwechsel angepasst werden musste. Um die Konzentration der Kollagenase zu verdünnen wurde nach der Inkubation das Gefäß mit Krebs-Ringer-Lösung aufgefüllt und im Anschluss nochmals zwei Minuten per Hand geschüttelt. Die Dispersion mit dem Pankreas wurde fünf Minuten zum

Sedimentieren gestellt. Nach Absaugen des Überstands wurde das Gefäß erneut mit Krebs-Ringer-Lösung gefüllt und der Inhalt anschließend in eine schwarze Glas-Petrischale überführt. Unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Zeiss) und der Beleuchtung durch Kaltlichtquellen (KL 150B, Schott) wurden die freigesetzten Langerhans'schen Inseln mit einer Eppendorf-Pipette aus dem angedauten exokrinen Pankreas herauspipettiert und in einer weiteren mit Krebs-Ringer-Lösung gefüllten Petrischale gesammelt. Dort wurden die Inseln mit Hilfe von Kanülen von eventuell noch anhaftenden exokrinem Gewebe befreit. Die Inseln wurden in einem schwarzen, konischen Plastikgefäß gesammelt und die Krebs-Ringer-Lösung soweit wie möglich abgenommen. Die so isolierten Pankreas-Inseln wurden für die Versuche oder zur Gewinnung von Einzelzellen verwendet.

Zur Gewinnung von Einzelzellen (LERNMARK 1974) wurden 500 µl calciumfreie Lösung in das konische Gefäß gegeben, zusammen mit den Inseln wieder aufgenommen und zu 4,5 ml calciumfreier Lösung pipettiert, um den Zellverband zu lösen. Zu Beginn der Inkubationszeit von 10 Minuten wurde der Ansatz für 10 Sekunden und zum Ende der Inkubationszeit für eine Minute auf Stufe 8 gevortext (Vortex-Genie 2, Scientific Industries). Anschließend wurde die Zellsuspension eine Minute bei 20°C und 300 x g zentrifugiert, bevor die calciumfreie Lösung soweit wie möglich abgesaugt und durch 5 ml RPMI-Lösung mit 10 mM Glucose ersetzt wurde. Nach Vortexen für 10 Sekunden wurde erneut wie oben angegeben zentrifugiert. Danach wurde das RPMI-Medium bis auf ca. 100 µl abgesaugt und das verbliebene RPMI-Medium mit den Inselzellen mehrmals in einer Pipettenspitze hochgesaugt und wieder abgegeben, um verbliebene Zellaggregate zu lösen. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dieser Pipettenspitze auf den markierten Mittelpunkt von Plastikpetrischälchen mit 35 mm Durchmesser (Nunclon<sup>TM</sup> Surface, Nunc) zu Anteilen von je 10 µl aufgeteilt. Für Zellen aus 10 isolierten Inseln wurde jeweils eine Petrischale vorbereitet. Die Zellen wurden drei Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank inkubiert, damit möglichst viele Zellen im Zentrum der Petrischalen oder Deckgläschen anwachsen, bevor pro Petrischale 2,5 ml RPMI-Medium mit 5 mM Glucose zugegeben wurden. Anschließend wurde die Zellkultur fortgesetzt.

Um eine höhere Ausbeute an Inseln pro Pankreaspräparation zu erzielen wurde die Isolierung nach GOTOH (GOTOH *et al.* 1985) verwendet, bei der die Kollagenase in den Pankreasgang injiziert wird, das solcher Art vorbehandelte Pankreas im Stück herausgenommen wird und dann in einer 37°C warmen Lösung das exokrine Pankreas verdaut wird. (Für detailliertere Ausführungen s. (BLECK 2006)).

### **3.4. Allgemeine molekularbiologische Methoden**

#### **3.4.1. Verwendete Lösungen**

##### **3.4.1.1. Bakterienkulturmedien**

###### LB-Medium

10 g/l Bakto-Tryptone, 5 g/l Bakto-Yeast-Extrakt, 8 g/l NaCl, und 1 g/l Glucose wurden in Wasser gelöst, der pH-Wert mit NaOH auf 7,2 eingestellt und autoklaviert. Vor Gebrauch wurde 100 mg/l Ampicillin oder 25 mg/l Kanamycin zugegeben.

###### LB-Agar

15 g/l Agar wurden in LB-Medium während des Autoklaviervorgangs gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurden der Lösung 100 mg/l Ampicillin oder 25 mg/l Kanamycin zugegeben, vorsichtig gemischt und jeweils ca. 20 ml des flüssigen Agars in 10 cm Plastik-Petrischälchen ausgegossen.

###### SOC-Medium

2% Bakto-Tryptone, 0,5% Bakto-Yeast-Extrakt, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl wurden in Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und autoklaviert. Nach dem Erkalten (mind. 60°C) wurden 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 20 mM Glucose unter sterilen Bedingungen zugefügt. Zur längerfristigen Lagerung wurden Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

##### **3.4.1.2. Puffer**

###### LoTE-Puffer

3 mM TRIS-HCl (pH 7,5) und 0,2 mM EDTA (Na<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O / pH 7,5) wurden in Wasser gelöst und sterilfiltriert. Lagerung bei 4°C

TBE-Puffer (10fach konzentriert)

Rotiphorese 10xTBE-Puffer, Carl Roth (1 M TRIS-Borat (pH 8,3) und 20 mM EDTA)

**3.4.1.3. Antibiotika**Ampicillin Stammlösung

100 mg/ml Ampicillin wurden in Wasser gelöst und sterilfiltriert. Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C.

Kanamycin Stammlösung

25 mg/ml Kanamycinsulfat wurden in Wasser gelöst und sterilfiltriert. Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C.

**3.4.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es, eine große Anzahl von Kopien einer spezifischen DNA-Sequenz zu produzieren, welche zur Klonierung oder zur Einführung von Mutationen eingesetzt werden kann (MULLIS et al. 1986). Bei einer Reaktion wird eine einzelsträngige DNA als Matrize für die Synthese eines neuen komplementären Stranges verwendet. Zunächst wird die doppelsträngige DNA bei einer Temperatur von 94 °C in Einzelstränge zerlegt (Denaturierungsphase). Daraufhin wird ein Paar von spezifischen Oligonucleotiden (Primer) an den gewünschten Stellen an die einzelsträngige Matrize anlagert (Hybridisierungsphase). Dies erfolgt bei geeigneten Temperaturen (50-65 °C), bei denen die Primer sich an die komplementären Sequenzen der DNA-Moleküle binden können. In der Elongationsphase synthetisiert eine thermostabile DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase) die Zielsequenz zwischen den gebundenen Primern. Bei diesem Schritt wird die Temperatur auf die optimale Wirktemperatur des Enzyms erhöht (z.B. 72 °C). Dieser Reaktionszyklus wird mehrfach hintereinander wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Anreicherung der gewünschten Zielsequenz kommt, die dann für Klonierungen weiterverwendet werden kann. Mit den verwendeten Composite-Primern wurden Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen an den Enden des PCR-Fragments angebracht. Durch die Wahl von Erkennungssequenzen für unterschiedliche Restriktionsenzyme am 5'-und 3'-Ende der PCR-Fragmente war



nach einem Restriktionsverdau eine in der Orientierung der cDNA festgelegte Subklonierung in den Vektor möglich. Die jeweiligen *forward* und *reverse composite* Primer trugen neben der kodierenden cDNA-Sequenz am 5'-Ende die Erkennungssequenz für die ausgewählten Restriktionsenzyme und mindestens fünf weitere Nucleotide, um die Effizienz des Restriktionsschnitts zu erhöhen. Um eine möglichst hohe Amplifikationsgenauigkeit zu erreichen, wurde in dieser Arbeit unter anderem die Pwo-DNA-Polymerase (peqLab) verwendet. Die Pwo-Polymerase besitzt eine 3'-und 5'-Exonuklease-Aktivität und ist in der Lage primäre Fehler der 5'-und 3'-Polymerase zu korrigieren (Proofreading-Aktivität).

Die PCR-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 oder 100 µl durchgeführt. Je nach verwendeter Polymerase unterschieden sich die Konzentrationen der verwendeten Komponenten entsprechend der Herstellerangaben.

Für einen 50 µl Reaktionsansatz wurden verwendet:

	<u>Sawady</u> <u>Pwo-DNA-Polymerase</u>	<u>Sawady</u> <u>Taq-DNA-Polymerase</u>	<u>Mid Range PCR'-System</u>
Template	100-500 ng	10-500 ng	50-250 ng
forward Primer	300 nM	100-500 nM	400 nM
reverse Primer	300 nM	100-500 nM	400 nM
dNTP-Mix (10 mM je Nucleotid)	200µM	200µM	350 µM
Polymerase	0,06 U/µl	0,025 U/µl	0,01-0,05 U/µl
10x Reaktionspuffer	5 µl	5 µl	5 µl
Wasser	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 50 µl

Auf ein Überschichten des Reaktionsansatzes mit Mineralöl, um ein Verdunsten der Proben in den Reaktionsgefäßen zu vermeiden, konnte verzichtet werden, da der verwendete Thermoblock (Primus Advanced, peqLab, Erlangen) über einen beheizbaren Deckel verfügt, und dadurch das Verdunsten der Bestandteile verhindert.

Die Proben wurden in dem Thermocycler nach folgendem allgemeinen Protokoll amplifiziert:

Anfangsdenaturierung	94°C	} x 25-30
Denaturierung	94°C	
Primer-Hybridisierung	50-65°C	
Elongation	72°C	
Endelongation	72°C	

Die Temperatur des Hybridisierungszyklus hängt von der Schmelztemperatur der Primer ab, die Elongationszeit hängt von der Länge des zu amplifizierenden Fragments ab. Der oben angegebene Reaktionszyklus wurde 25-30 Mal wiederholt, die Proben wurden anschließend noch fünf Minuten bei 72°C inkubiert (verlängerte Elongation). Die amplifizierte DNA wurde aufgereinigt (s. Kapitel 3.4.5) und auf einem Agarosegel analysiert.

### 3.4.3. Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der horizontalen Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Diese Methode wurde verwendet, um die Nucleinsäure-Fragmente zu analysieren oder zu isolieren. Die Agarosekonzentration lag je nach Größe der zu trennenden Fragmente bei 0,8 – 2,0%. Die entsprechende Menge an Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf eine Temperatur von ca. 50°C wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zur Fluoreszenzanfärbung der DNA-Banden zugesetzt und das Gel in die Gelkammer gegossen. Die aufzutrennende DNA-Lösung wurde mit Ladepuffer gemischt und auf das erkaltete Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in TBE-Puffer bei einer Spannung von 60–120 V (*Horizon 58* Elektrophoresekammer, GIBCO BRL). Als DNA-Längenstandard wurde zusätzlich ein 1 kb DNA-Größenmarker aufgetragen. Anschließend konnten die DNA-Fragmente aufgrund des interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht (UV-Transilluminator mit Dunkelhaube BioStep, Jahnsdorf) analysiert und für präparative Zwecke aus dem Gel herausgeschnitten werden. Zur Dokumentation wurden die Gele mit einer Digitalkamera (Olympus, Camedia c-4040 zoom) fotografiert und mit der Bio-Imaging Software ArgusX1 (BioStep, Jahnsdorf) bearbeitet und ausgewertet.

#### 3.4.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem *QIAex II Gel Extraction Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben. Dazu wurde zunächst das gewünschte Fragment mit einem Skalpell unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in dem dazugehörigen Puffer bei 50°C geschmolzen. Die entstandene Lösung wurde auf die mitgelieferte Säule gegeben, in der die DNA selektiv und quantitativ an eine Silikatmatrix bindet. Alle anderen Bestandteile (Agarose, Proteine, Salze und Ethidiumbromid) wurden durch die einzelnen Waschschriffe entfernt. Die gebundene Nukleinsäure wurde in einem letzten Schritt mit Wasser von der Säule eluiert und falls erforderlich bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

#### 3.4.5. Restriktion und Ligation von Plasmid DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen und spalten spezifische DNA-Sequenzen. Die Hydrolyse der DNA mit den Restriktionsendonukleasen erfolgte in dem vom Hersteller angegebenen zugehörigen Puffersystem bei empfohlener Temperatur, Menge und Zeit. Der Restriktionsverdau wurde bei unterschiedlichen Optima der beiden Enzyme nacheinander mit zwischenzeitlicher Aufreinigung (s. dieses Kapitel unten) durchgeführt. Neben dem präparativen Zweck der Restriktion wurden Restriktionsanalysen zur Überprüfung einer erfolgreichen Subklonierung durchgeführt. Die gespaltenen DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

Durch die Inkubation mit alkalischer Phosphatase (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, CIAP) wurden die Phosphatreste an den 5'-und 3'-Enden der Plasmid-DNA abgespalten. Die Dephosphorylierung verhindert eine Religation des Vektors und erhöht damit die Effizienz der Subklonierung. Da das Enzym in allen gängigen Restriktionspuffern aktiv ist, wurde zu den bereits verdauten Restriktionsansätzen 1 U CIAP pipettiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug in der Regel 50 µl. Durch anschließendes Erhitzen bei 72°C für 10 Minuten wurde das Enzym inaktiviert.

Für die Ligation wurde 50-100 ng linearisierte, dephosphorylierte und aufgereinigte Vektor-DNA und 150-300 ng des verdauten, ebenfalls aufgereinigten PCR-Produkts (molares Verhältnis ca. 1:3) für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 1U T4-DNA-Ligase in dem dazugehörigen Puffer inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug in der Regel 20 µl. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Reaktionsansatz für 10 Minuten auf 65°C erhitzt.

Die Aufreinigung der DNA Fragmente erfolgte mit dem *Invisorb Spin PCRapid Kit* von Invitex nach Herstellerangaben. Hierbei wurde der Reaktionsansatz direkt auf die mitgelieferte Säule gegeben, an deren Oberfläche die DNA selektiv bindet. Alle anderen Bestandteile (Primer, Nucleotide, Enzyme und Salze) wurden durch die einzelnen Waschschrte entfernt. Die gebundene Nucleinsäure wurde in einem letzten Schritt mit Wasser von der Säule eluiert und falls erforderlich bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Für eine effiziente Transformation der Bakterien mittels Elektroporation ist es wichtig, mit möglichst salzarmen Lösungen zu arbeiten, um einen geringen elektrischen Leitwert zu gewährleisten (SAMBROOK und RUSSELL 2001). Aus diesem Grund wurde der Ligrationsansatz vor der Elektroporation aufgereinigt und gleichzeitig aufkonzentriert. Das Reaktionsvolumen wurde mit LoTE-Puffer auf 200 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 3 µl Glycogen (20 µg/µl), 100 µl Ammoniumacetat (10 M) und 900 µl Ethanol 100% wurde gut gemischt und mehrmals gevortext. Es folgte ein erster Zentrifugationsschritt bei 21.000 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur um die DNA zu fällen. Durch den Zusatz von Glycogen war es möglich, nach der Zentrifugation ein DNA-Pellet zu erkennen. Der Überstand wurde abgesaugt und zweimal mit 500 µl Ethanol 70% gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschrten wurde für fünf Minuten bei 21.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und das DNA-Pellet ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet bis es durchsichtig war. Das trockene Pellet wurde am Ende in 5 µl Wasser aufgenommen und resuspendiert.

### 3.4.6. Herstellung elektrokompetenter Bakterien und Transformation mittels Elektroporation

Die effiziente Transformation von *E. coli* Bakterien mit Nucleinsäuren erfordert eine Desintegration der Bakterienmembran. Neben anderen Verfahren kann dies auch durch ein starkes elektrisches Feld erreicht werden. Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase müssen zuvor durch sequentielle Waschschr tte in ein Medium mit geringem elektrischem Leitwert überführt werden. Durch das Anlegen eines starken elektrischen Feldes (5 kV/cm) kann dann für 4 - 5 ms die Membran desintegriert werden, ohne dass die Bakterien absterben. Die Aufnahme von Fremd-DNA wird dadurch ermöglicht.

400 ml LB-Medium wurden mit 4 ml einer dichtbewachsenen *E. coli* Übernachtkultur angeimpft. Die Bakterienkultur wurde für weitere 3 - 4 Stunden bis zu einer OD<sub>600</sub> nm von 0,7 im Rundsch ttler bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Die so erhaltene Bakteriensuspension wurde 30 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend 15 Minuten bei 4°C und 4000 x g pelletiert. Die Resuspendierung des Bakterienpellets erfolgte in 400 ml einer 10%igen (v/v) Glycerol-Wasser-Mischung. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 200 ml der 10%igen (v/v) Glycerol-Lösung aufgenommen. Es folgten zwei weitere Waschschr tte, bestehend aus Zentrifugation und Resuspension in 10 ml und danach in 1 ml der 10%igen (v/v) Glycerol-Lösung. Nach dem letzten Waschschr tt waren die Bakterien der 400 ml Kultur in 1 ml 10%iger (v/v) Glycerol-Lösung konzentriert. Die Lagerung der in 60 µl Aliquots aufgeteilten Bakteriensuspension erfolgte bei -70°C.

40 µl einer Suspension elektrokompetenter *E. coli* Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Thermo Scientific, 2 mm Elektrodenabstand)  berf hrt. Jeweils 1 ng aufgereinigtes Plasmid bzw. 1 µl eines gereinigten, aufkonzentrierten Ligationsansatzes (entsprechend etwa 50 ng DNA) wurde gut mit den elektrokompetenten Bakterien durchmischt und für 4 - 5 ms einer elektrischen Spannung von 2,5 kV bei einer Kapazität von 25 µF ausgesetzt (Elektroporator Thermo Scientific). Anschließend wurden die Bakterien in 0,5 ml antibiotikafreiem SOC-Medium überführt und für eine Stunde bei 37°C und 220 rpm im Schüttelinkubator inkubiert, um die Expression der Resistenzgene zu

gewährleisten. Nach der Inkubation wurden 100 - 250 µl der Bakteriensuspension auf Agarplatten mit einem sterilen Glasspatel ausgestrichen. Dabei bewirkt der Zusatz eines Antibiotikums zum Agarmedium, dass nur mit dem Plasmid transformierte Bakterien Kolonien auf dem Agar bilden können. Nach ca. 12 Stunden Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C zeigten sich auf den Agarplatten antibiotikaresistente Klone, die auf das rekombinante Plasmid untersucht wurden.

### **3.4.7. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Unter den mit rekombinantem Plasmid transformierten Bakterien mussten die Klone identifiziert werden, die das gewünschte Plasmid korrekt amplifizierten. Hierfür wurden 5 - 15 Bakterienkolonien jeweils in 2 ml antibiotikahaltigem (100 mg/ml Ampicillin oder 25 mg/ml Kanamycin) LB-Medium überführt. Die Bakterienklone wuchsen für ca. 12 Stunden bei 37°C und 220 rpm im Schüttelinkubator. Die Isolation der Plasmid-DNA aus 1,5 ml der Bakterienkultur erfolgte mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben. Der Bakterienaufschluss beruht dabei auf einer alkalischen SDS-Lyse.

Positive Klone wurden mit wasserfreiem Glycerol für die Kryokonservierung stabilisiert. Dazu wurden 150 µl Glycerol in einem 2 ml Kryoröhrchen (Sarstedt) vorgelegt und mit 850 µl der Übernachtskultur versetzt und gut gevortext. Die so erhaltenen Bakterienstocks wurden bei -70°C aufbewahrt.

Zur Isolierung größerer hochreiner Plasmidmengen der verifizierten Plasmidkonstrukte wurde eine Impföse des bei Raumtemperatur aufgetauten Glycerolstocks auf einer antibiotikahaltigen Agarplatte ausgestrichen und ca. 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Von den auf der Platte gewachsenen Kolonien wurde eine einzelne in 250 ml LB-Medium unter Zusatz des jeweils benötigten Antibiotikums 12 Stunden bei 37°C und 220 rpm im Schüttelinkubator vermehrt. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem NucleoBond PC-100 Midi Prep Kit oder NucleoBond PC-500 Maxi Prep Kit nach Herstellerangaben. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

### 3.4.8. Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Nucleinsäuren (DNA und RNA) wurden durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm quantifiziert (Eppendorf, BioPhotometer). 1 OD entspricht unter Berücksichtigung einer 1:1000 Verdünnung einer Konzentration von 50 µg/µl doppelsträngiger DNA. Durch Messung der Absorption bei 280 nm kann zusätzlich der Gehalt an verunreinigenden Proteinen innerhalb einer Probe bestimmt werden, so dass das Verhältnis zwischen 260/280 nm Aufschluss über die Reinheit der Nucleinsäuren gibt. Bei Plasmid-Isolierungen unter Verwendung der Nucleo-Bond Säulen wurden Ratio-Werte von 1,7 - 1,9 erreicht, und können somit als reine Präparationen bezeichnet werden.

## 3.5. Konstruktion der Vektor-Plasmide

Zur fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung der Insulin-Sekretgranula wurden diese selektiv mit einem fluoreszierenden Protein markiert. Das Insulin in den Sekretgranula diente dabei als Zielprotein. Zu diesem Zweck wurde eine rekombinante DNA hergestellt, die für ein Fusionsprotein aus humanem Präproinsulin mit EGFP codiert. Für den nicht-viralen Gentransfer sind Plasmide mit speziellen Strukturelementen für die Genexpression in Eukaryontenzellen notwendig. Da eine zu exprimierende cDNA als Abbild der mRNA keine regulatorischen Elemente zur Kontrolle der Genaktivität besitzt, muss der Expressionsvektor eine in der Wirtszelle wirksame *Promoter/enhancer*-DNA-Sequenz zur Verfügung stellen. Die *Promoter/enhancer*-Region ist für die Initiation der Transkription der cDNA erforderlich und dient als Startpunkt für die RNA-Polymerase II. Eine der cDNA folgende Polyadenylierungssequenz im Plasmid dient zur Termination der Transkription und zur Polyadenylierung der synthetisierten mRNA. Ein Resistenzgen eines in Eukaryonten wirksamen Antibiotikums kann zur Selektion von stabil-transfizierten Zellklonen genutzt werden. Weitere Strukturelemente sind eine *Multiple cloning site* für eine einfache Subklonierung einer cDNA, ein prokaryontischer Replikationsursprung zur Vermehrung des Plasmids in *E. coli* und ein in Prokaryonten wirksames Resistenzgen zur Selektion in *E. coli*.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmidvektor pEGFP-N1 (Clontech) enthält den *Immediate-early promoter/enhancer* des humanen Zytomegalievirus, der

eine hohe, konstitutive Genexpression in einer Vielzahl von unterschiedlichen Säugetierzellen erlaubt.

Stabil transformierte Zellklone können bei mit dem Plasmid pEGFP-N1 transfizierten Zellen durch Zugabe des Aminoglycosid-Antibiotikums G418 (Geneticin) zum Nährmedium selektioniert werden. G418 bindet spezifisch an die 80S-Ribosomen in eukaryontischen Zellen und blockiert damit die Proteinbiosynthese. Das Neomycin-Resistenzgen auf dem pEGFP-N1-Vektor codiert für eine Aminoglycosid-Phosphotransferase, die G418 durch Phosphorylierung deaktiviert.

### 3.5.1. Expressionsvektor pEGFP-N1/hIns-EGFP

Für die Produktion der rekombinanten Nucleinsäure wurde die cDNA des humanen Präproinsulins, die in dem Vektor pAlter-1 vorlag, mittels PCR amplifiziert (s. Kapitel 3.4.2). Dabei wurden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XhoI und BamHI generiert. Dafür wurden Primer mit folgenden Sequenzen verwendet:

<u>Primerbezeichnung</u>	<u>Oligonucleotidsequenz</u>
hIns-BamHI (rv)	TAGGATCCCCGTTGCAGTAGTTCTCCAGCTGGTAGA
hIns-XhoI (fw)	GTACACTCGAGATGGCCCTGTGGATGCG

Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung von pwo-DNA Polymerase (s. Kapitel 3.4.2) nach folgendem Zyklus:

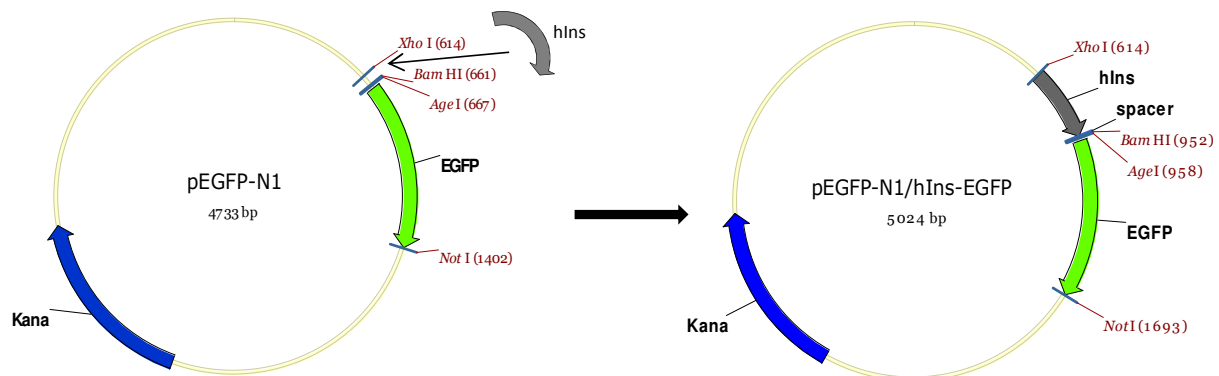
Anfangsdenaturierung	94°C	3 Minuten	} x 25
Denaturierung	94°C	1 Minute	
Primer-Hybridisierung	60°C	1 Minute	
Elongation	72°C	1 Minute	
Endelongation	72°C	5 Minuten	

Das so erhaltene PCR-Fragment wurde mit den angegebenen Enzymen geschnitten, aufgereinigt und in den in gleicher Weise geschnittenen, linearisierten Expressionsvektor pEGFP-N1 ligiert. Dieser wurde, um eine Religation zu vermeiden, vorher mit CIAP dephosphoryliert und ebenfalls über eine Säule aufgereinigt. Die Ligation erfolgte wie beschrieben für zwei Stunden bei Raumtemperatur (s. Kapitel 3.4.5).

Um die Effizienz der anschließenden Elektrotransformation zu erhöhen, wurde der Ligationsansatz aufgereinigt und aufkonzentriert (s. Kapitel 3.4.5).



Nach der Elektroporation (s. Kapitel 3.4.6) erfolgte die Selektion transformierter Bakterienklone auf kanamycinhaltigen Agarplatten.



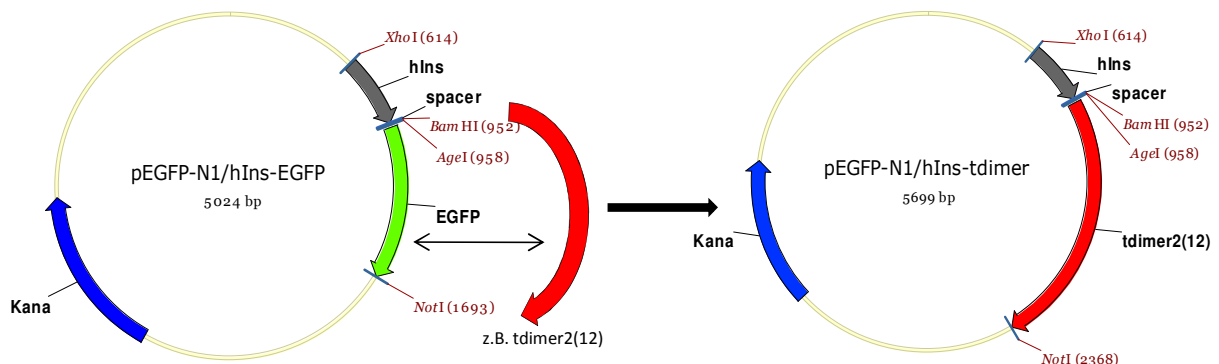
**Abb. 3.2 Schematische Darstellung der Klonierung von pEGFP-N1/hIns-EGFP.** Der Expressionsvektor pEGFP-N1 wurde in der multiple cloning site mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI geschnitten, und mit der DNA des humanen Präproinsulins (hIns) ligiert. Der resultierende Expressionsvektor codiert für ein Fusionsprotein aus Humaninsulin und EGFP, bei dem das EGFP am C-Terminus der A-Kette des Insulins exprimiert wird.

### 3.5.2. Expressionsvektor pEGFP-N1/hIns-tdimer

Der in Kapitel 3.5.1 beschriebene Vektor pEGFP-N1/hIns-EGFP diene als Ausgangsprodukt für die Konstruktion eines zweiten Expressionsvektors, der die Information für ein Fusionsprotein aus Humaninsulin und einem rot fluoreszierenden Protein, dem tdimer2(12) trägt. Die cDNA für tdimer2(12) (erhalten von Roger Tsien, San Diego, California) wurde mittels PCR amplifiziert, und dabei die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme AgeI und NotI generiert. Die Primer wurden so erstellt, dass die Linker-Region zwischen dem Insulin und dem tdimer identisch war mit der Linker-Region zwischen Insulin und dem EGFP (s. Kapitel 3.5.1). Dafür wurden Primer mit folgenden Sequenz verwendet:

<u>Primerbezeichnung</u>	<u>Oligonucleotidsequenz</u>
tdimer-NotI (fv)	AATTATACGGGCCCGCCTACAGGAACAGGTGGTGGCGGC
tdimer-AgeI (fw)	TACCGGTCGCCACCATGGTGGCCTCCTCCG

Das so erhaltene PCR-Fragment wurde mit den angegebenen Enzymen geschnitten, aufgereinigt und in den in gleicher Weise geschnittenen, linearisierten Expressionsvektor pEGFP-N1/hIns-EGFP ligiert. Dieser wurde, um eine erneute Ligation mit dem ausgeschnittenen EGFP-Nucleinsäureabschnitt zu vermeiden, vor der Ligation in ein 1%iges Agarosegel (Low Melting Agarose) aufgetragen, die Bande des Vektors aus dem Gel geschnitten und über eine Säule aufgereinigt (s. Kapitel 3.4.4) Die nachfolgenden Schritte erfolgten analog der Klonierung in Kapitel 3.5.1.



**Abb. 3.3 Schematische Darstellung der Klonierung von pEGFP-N1/hIns-tdimer.** Der Expressionsvektor pEGFP-N1/hIns-EGFP wurde mit den Restriktionsenzymen AgeI und NotI geschnitten, und mit der DNA des fluoreszierenden Proteins tdimer(2)12 ligiert. Der resultierende Expressionsvektor codiert für ein Fusionsprotein aus Humaninsulin und tdimer, bei dem das tdimer am C-Terminus der A-Kette des Insulins exprimiert wird.

### 3.5.3. Expressionsvektor pEGFP-N1/hIns-timer

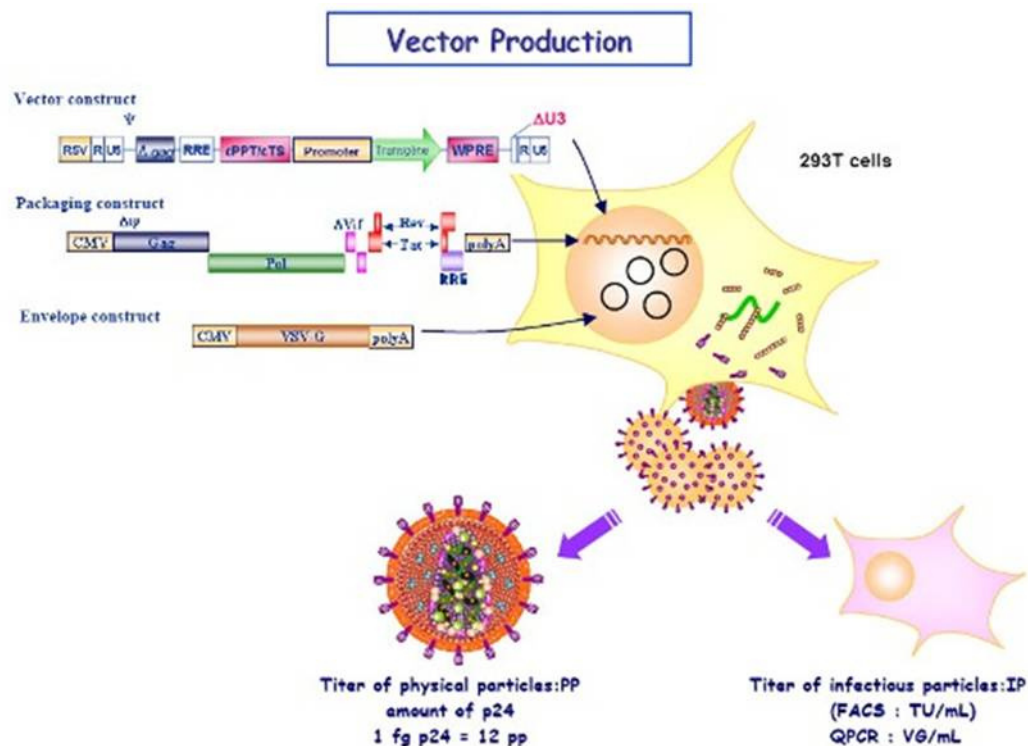
Die Konstruktion des Plasmids pEGFP-N1/hIns-timer erfolgte analog der des Plasmids pEGFP-N1/hIns-tdimer. Die DNA-Sequenz für das fluoreszierende timer-Protein wurde jedoch nicht mittels PCR amplifiziert, sondern aus dem kommerziell erhältlichen Vektor pTimer (Clontech) mit den Restriktionsenzymen AgeI und NotI herausgeschnitten und anstelle des EGFP in den Vektor ligiert. Die Linker-Region zwischen dem Insulin und dem „timer“-Protein war auch in diesem Konstrukt identisch mit der Linker-Region des Insulin-EGFP-Vektors (s. Kapitel 3.5.1).

### 3.6. HIV I-basiertes lentivirales Gentransfersystem

Virale Vektoren können verwendet werden, um fremde genetische Informationen in eukaryotische Zellen einzubringen. Weil Viren in der Lage sind, eukaryotische Zellen zu infizieren und sie nach der Infektion einer Zelle deren Synthesemaschinerie dazu veranlassen, ihr genetisches Material zu produzieren, stellen sie besonders gut geeignete Vektoren für den Gentransfer dar. Lentivirale Vektoren haben den Vorteil gegenüber anderen viralen Vektoren, dass sie in der Lage sind, ruhende oder nur langsam teilende Zellen zu infizieren und ihr genetisches Material in das Genom der Zielzelle zu integrieren (LEWIS et al. 1992). Dies führt zu einer stabilen Expression des Zielgens in den infizierten Zellen und deren Tochterzellen (VERMA und SOMIA 1997).

Die replikationsdefizienten Viruspartikel entstehen nach Co-Transfektion (Calcium-Phosphat-Präzipitation) dreier Plasmide in die Verpackungszelllinie HEK 293T, die für die einzelnen lentiviralen Komponenten codieren (Abb. 3.4). Dazu gehören: 1) Das Envelope-Plasmid pcDNA3/MD.G (Abb. 3.6), das für das Glycoprotein der Hülle codiert. Es ist verantwortlich für das Binden der Lentiviralen Vektoren an die Zielzelle. 2) Das Packaging-Plasmid pCMV $\Delta$ 8.93 (Abb. 3.7), das für die strukturelle und enzymatische Ausstattung des Virions und auch für regulatorische Proteine codiert, und 3) das Vektor-Plasmid pRRL-CGW-SIN (Abb. 3.5), das für das virale Genom (RNA) und das Transgen codiert.

Es entstehen replikationsdefiziente VSV-G-pseudotypisierte Viruspartikel, die direkt zur Infektion der Zielzellen verwendet werden können. Das Expressionskonstrukt wird revers transkribiert und in das Genom integriert.



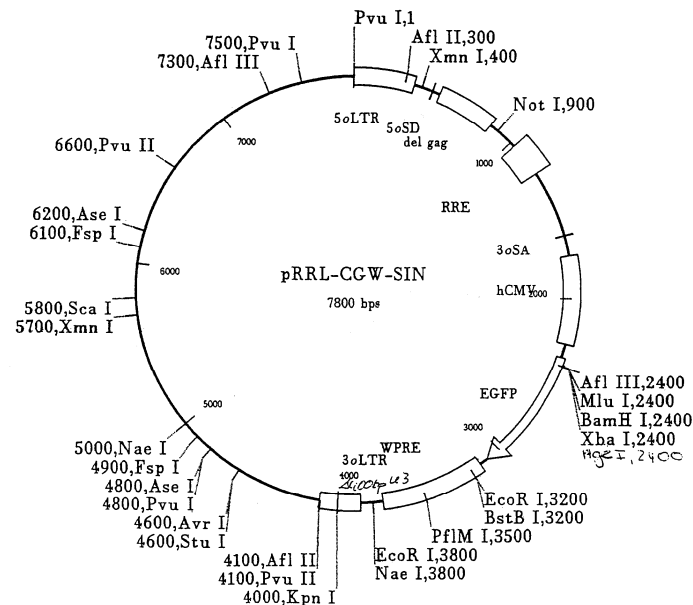
**Abb. 3.4 Schematische Darstellung der Produktion lentiviraler Vektoren.** Replikationsdefiziente pseudotypisierte Lentiviren entstehen durch Co-Expression der viralen Verpackungselemente und des Vektor-Genoms in der Verpackungszelllinie 293T. Core und enzymatischen Komponenten sind Bestandteile des HI-Virus, während die Hülle von einem anderen Virus stammt, in diesem Fall von dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV). Diese zeigt eine hohe Stabilität und vermag eine Vielzahl verschiedener Zellentypen zu infizieren. Abbildung adaptiert von <http://tronolab.epfl.ch/page58114.html>

### 3.6.1. Vektor Plasmid pRRL-CGW-SIN

Das lentivirale Vektor Plasmid kodiert nicht für alle lentiviralen Proteine sondern nur für diejenigen, die erforderlich sind für die Verpackung, Transduktion und stabile Integration der cDNA ins Genom. Dazu gehören das Verpackungssignal  $\psi$ , das Rev Responsive Element (RRE), und die retroviralen 5' und 3'-LTR (Long Terminal Repeat).

Rev ist ein Protein (das codierende Gen *rev* liegt auf dem Packaging Plasmid), das an das RRE viraler RNA bindet, und dadurch deren Transport aus dem Kern in das Cytoplasma verstärkt. Rev ist demnach ein regulatorisches Protein, das die

Expression der Strukturgene gag, pol und env im Cytoplasma erhöht, und auch gleichzeitig in der Lage ist, die Expression der regulatorischen Gene tat und rev zu verringern. Die Deletion dieses RRE/Rev-Systems hätte einen drastischen Abfall des Virustiters zur Folge



**Abb. 3.5 Lentivirales Vektorplasmid pRRL-CGW-SIN.** Das Plasmid codiert nicht für das vollständige virale Genom sondern nur für die für den Transgen-Transfer erforderlichen Proteine und das Verpackungssignal. Der Vektor hat einen internen CMV-Promotor, der für die Transkription des Transgens vonnöten ist. Das Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element (WPPE) dient der posttranskriptionellen Erhöhung der Transgen-Expression.

Der 3'-LTR dient bei der reversen Transkription als Template für die U3-Regionen (promotor und enhancer Region) beider LTRs im resultierenden Provirus. Um die Möglichkeit der Bildung replikationskompetenter Retroviren zu minimieren wurden in dieser U3-Region 400 Basenpaare entfernt. Dadurch wird die 5'-LTR-Region des integrierten Vektors nahezu komplett inaktiv. Die SIN (self inactivating) Vektoren sind demnach unfähig, ihre gesamte RNA effizient zu transkribieren und benötigen daher einen internen Promotor (hier der humane CMV-Promotor), um das Transgen (hier fluoreszierende Fusionsproteine) zur Expression bringen zu können.

Um eine mögliche Wiederherstellung der veränderten U3-Region durch homologe Rekombination mit einer intakten 5'-LTR während der Co-Tansfektion in 293T Zellen zu vermeiden, wurde die U3-Region im 5'-LTR gegen den Rous Sarcoma Virus (RSV) LTR Promotor ausgetauscht (RRL: RSV replacing the U3 region).

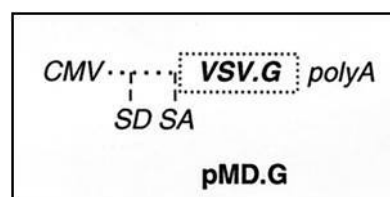
Das Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element (WPRE) erhöht posttranskriptionell die Transgen-Expression (ZUFFEREY et al. 1999).

In der Vektorbeschreibung CGW steht C für den internen CMV-Promotor, G für das Reportergen (E)GFP und W für das WPRE.

### 3.6.2. Envelope Plasmid pcDNA3/MD.G

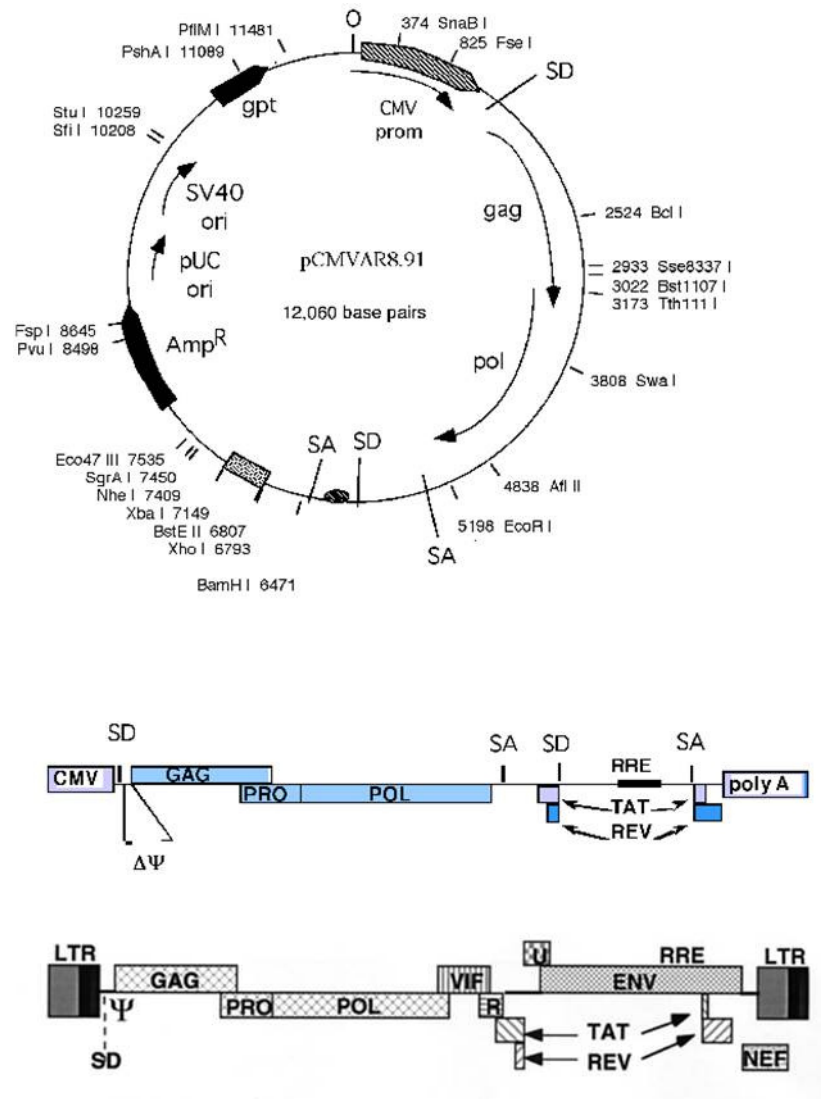


**Plasmid name:** pMD.G  
**Plasmid size:** 6010 bp  
**Constructed by:** Daniel Ory (map redrawn by Patrick SALMON)  
**Construction date:** August 25, 1994  
**Comments/References:** pXF3 (poison seq minus pBR322, low copy plasm) and human CMV ie prom from pBC12/CMV/IL2 (B. Cullen, Cell 46, 1986) (pBC12 = pXF3 + SV40 ori). Human beta globin seq (exons 2 and 3, IVS2, polyA) from pucMdBs(R)S (gift M. Sadleir). VSV G from pSVGL.



**Abb. 3.6 Lentivirales envelope Plasmid.** Die Abbildung zeigt die Vektorkarte (links) und das resultierende Gen (rechts unten) des Plasmids pMD.G. Das Gen codiert für ein heterologes G-Protein der Hülle des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) um den Vektor zu pseudotypisieren. Neben einer hohen Stabilität zeigen die damit generierten viralen Vektoren eine große Infektionsbreite für verschiedene Zelltypen.

### 3.6.3. Packaging Plasmid pCMVΔR8.93



**Abb. 3.7 Lentivirales packaging Plasmid.** Die Abbildung zeigt die Vektorkarte (oben) und das resultierende Gen (mitte) des Plasmids pCMVΔ8.91. Das in dieser Arbeit verwendete packaging-Plasmid pCMVΔ8.93 unterscheidet sich zu dem abgebildeten darin, dass die genetische Information (tat) für das regulatorische Protein TAT nicht mehr enthalten ist. TAT ist ein für die Virenreplikation essentieller Transaktivator, dessen Deletion eine deutliche Verringerung des Virentiters zu Folge hätte. In Kombination mit einem pRRL-SIN-Vektor ist diese Verringerung jedoch zu vernachlässigen (DULL et al. 1998). Aus Gründen der biologischen Sicherheit ist demnach ein tat-defizientes Verpackungsplasmid vorzuziehen. Zum Vergleich ist unten ein nicht abgeschwächtes vollständiges HIV-Provirus dargestellt (ZUFFEREY et al. 1997). Quelle: [http://lentiweb.com/img/pCMV\\_dR8\\_93.gb](http://lentiweb.com/img/pCMV_dR8_93.gb)

### 3.6.4. Konstruktion des lentiviralen Vektorplasmids pRRL-CGW-SIN/hIns-EGFP

Der Vektor pEGFP-N1/hIns-EGFP (s. Kapitel 3.5.1) diene als Matrize für das Fusionsprotein aus Humaninsulin und EGFP, welches in den lentiviralen Expressionsvektor pRRL-CGW-SIN eingebracht werden sollte. Zu diesem Zweck wurde dieser codierende Bereich (hIns/EGFP) mittels PCR amplifiziert (s. Kapitel 3.4.2). Dabei wurden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme MluI und BstBI generiert.

Es wurden Primer mit folgenden Sequenzen verwendet:

Primerbezeichnung    Oligonucleotidsequenz

hIns/pRRL-BstBI (rv)    CGTTTCGAATTACTTGTACAGCTCGTCCAT

pRRL/hIns-MluI (fw)    TAACGCGTATGGCCCTGTGGATGC

Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung von pwo-DNA Polymerase (s. Kapitel 3.4.2) nach folgendem Zyklus:

Anfangsdenaturierung	94°C	3 Minuten	} x 25
Denaturierung	94°C	1 Minute	
Primer-Hybridisierung	60°C	1 Minute	
Elongation	72°C	1 Minute	
Endelongation	72°C	5 Minuten	

Das so erhaltene PCR-Fragment wurde mit den angegebenen Enzymen geschnitten, aufgereinigt und in den in gleicher Weise geschnittenen, linearisierten Expressionsvektor pRRL-CGW-SIN ligiert. Dieser wurde, um eine erneute Ligation mit dem ausgeschnittenen EGFP Nucleinsäureabschnitt zu vermeiden, vor der Ligation in ein 1%iges Agarosegel (Low Melting Agarose) aufgetragen, die Bande des Vektors aus dem Gel geschnitten und über eine Säule aufgereinigt (s. Kapitel 3.4.4). Die nachfolgenden Schritte erfolgten analog der Klonierung des Vektors pEGFP-N1/hIns-EGFP (s. Kapitel 3.5.1).

### 3.6.5. Produktion replikationsdefizienter viraler Vektoren

Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an das Kapitel 16.22, Current Protocols in Molecular Biology (2002), Generation of HIV-1-Based Lentiviral Vector Particles.



### 3.6.5.1. Verwendete Lösungen

#### Calciumchlorid-Lösung (2M)

2 M  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  wurden in Wasser gelöst, sterilfiltriert und in Aliquots bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### HeBS-Puffer (2fach konzentriert)

0,28 M NaCl, 0,05 M HEPES und 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wurden in Wasser gelöst und der pH-Wert mit NaOH auf 7,05 eingestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und in Aliquots bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### Natriumbutyrat Stammlösung (500 mM)

500 mM Natriumbutyrat wurden in Wasser gelöst, der pH-Wert mit 10 N NaOH auf 7,0 eingestellt und die Lösung sterilfiltriert. Die Lösung konnte bis zu 6 Monate bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert werden.

#### Polybrene Stammlösung (6 mg / ml)

6 mg/ml Polybrene wurden in Wasser gelöst, sterilfiltriert und in Aliquots bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.6.5.2. Co-Transfektion der lentiviralen Plasmide, Ernte und Aufkonzentrierung der produzierten lentiviralen Partikel

Bei der Transfektion werden fremde Nucleinsäuren (z.B. Plasmid-DNA) von eukaryotischen Zellen aufgenommen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde die von Soneoka beschriebene Calciumphosphatmethode (SONEOKA et al. 1995) verwendet. Dabei handelt es sich um eine transiente Transfektionsmethode, weil die in die eukaryotischen Zellen eingebrachten fremden Nucleinsäuren im Laufe der Zellteilungen verloren gehen. Der genaue Mechanismus der DNA-Aufnahme bei dieser Methode ist im Einzelnen noch nicht verstanden. Vermutlich wird die DNA an Calciumphosphatkristalle gebunden und durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und dort zur Expression gebracht. Für die Transfektion wurden 293T-Zellen verwendet. Die 293T-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, die stabil das große SV40 T-Antigen exprimieren (DUBBRIDGE et al. 1987) Dadurch kommt es zur Replikation der Plasmide, die den

SV40-Replikationsursprung (ori) tragen. Dies führt zu einer stärkeren Expression der auf diesen Plasmiden kodierten Proteine.

$5 \times 10^6$  293T-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in 15 cm-Kulturschalen ausgesät. Der folgende Transfektionsmix wurde am Tag der Transfektion frisch hergestellt:

37,5 µg Vektorplasmid (pRRL-CGW-SIN/hIns-EGFP), 25 µg Packaging Plasmid (pCMVΔR8.93) und 12,5 µg Envelope Plasmid (pcDNA3/MD.G) wurden mit Wasser auf 1095 µl ergänzt und gemischt. Anschließend wurden 155 µl  $\text{CaCl}_2$ -Lösung dazugegeben und nochmals sorgfältig gemischt. Diese Lösung wurde dann langsam tropfenweise und unter ständigem Schütteln zu 1250 µl HeBS-Lösung gegeben. Innerhalb der nächsten mindestens 20 bis maximal 30 Minuten kam es zur Ausbildung der Präzipitate. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium vom Vortag gegen frisches Zellkulturmedium ausgetauscht und 27,5 µl einer 25 mM Chloroquin-Lösung (25 µM) in PBS dazu gefügt. Chloroquin vermag den Virustiter zu verdoppeln. Es neutralisiert den pH-Wert der Vesikel und hemmt dadurch lysosomale DNAsen. Die 2,5 ml Transfektionsgemisch wurden dann tropfenweise auf die Zellen gegeben und die Platte dabei vorsichtig geschüttelt, so dass sich das Präzipitat einheitlich über die gesamten Zellen verteilt und sich nicht nur in der Mitte ansammelt. Die Zellen wurden dann über Nacht inkubiert, und am nächsten Morgen das Medium gewechselt. Dem Medium wurde dabei 500 µl einer 500 mM Natriumbutyrat-Lösung (10 mM) zugesetzt. Der Zusatz von Natriumbutyrat vermag den Virustiter um ein Mehrfaches zu erhöhen (SONEOKA *et al.* 1995), (GASMI *et al.* 1999). Die Expression transfizierter Plasmide, die Gene unter der Kontrolle eines CMV-Promotors enthalten werden dadurch induziert. Es folgte eine erneute Inkubation über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurden die produzierten pseudoviralen Partikel geerntet indem das Medium abgenommen und für fünf Minuten bei 500 x g zentrifugiert wurde. Zur Aufkonzentrierung der Viren folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt des gewonnenen Überstandes bei 50.000 x g und 4 °C im Ausschwingrotor (TST 28.38, Kontron) für 90 Minuten (Centrikon T-2060, Kontron). Der Überstand wurde verworfen, und das Virenpellet in 1 ml kalter Krebs-Ringer-Lösung (enthielt Pen/Strep) für eine Stunde auf Eis resuspendiert. Das so erhaltene Virus-Konzentrat wurde in 1,5 ml Eppendorf-Cups bei -80 °C gelagert. Die Zellen wurden ein weiteres Mal in frischem Medium über Nacht inkubiert und am

darauffolgenden Tag erneut Viren geerntet. Der Virentiter wurde mittels Real-Time PCR bestimmt (SAMBROOK und RUSSELL 2001).

### **3.7. Transfektion von insulinproduzierenden Zelllinien**

#### **3.7.1. Transiente Transfektion**

##### **3.7.1.1. Polyethylenimin-basiert**

Die transiente Transfektion von MIN6-Zellen wurde mit Hilfe des jetPEI<sup>TM</sup> Transfektionsreagenz durchgeführt. Dabei schließt ein lineares Polyethylenimin (PEI) die zu transfizierende DNA in positiv geladene Partikel ein, die mit den negativ geladenen Proteoglykanen der Zelloberfläche interagieren und durch Endozytose von der Zelle aufgenommen werden. Durch das positiv geladene jetPEI wird der endosomale pH-Wert gepuffert und die Degradation der DNA verhindert. Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Ca.  $10^4$  MIN6-Zellen wurden 48 Stunden vor der Transfektion auf Kollagen-beschichtete Deckgläschen (s. Kapitel 3.2.2) ausgesät und in 3,5 cm Schälchen kultiviert. Einzuschleusende DNA Menge und jetPEI standen unter den gewählten Reaktionsbedingungen jeweils im Verhältnis 1:2. Die Zellen wurden mit 1,5 µg Plasmid-DNA und 3 µl jetPEI transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium gegen frisches DMEM-Medium getauscht. Die mikroskopische Betrachtung der Zellen erfolgte frühestens 24 Stunden nach deren Transfektion.

##### **3.7.1.2. Elektroporation**

Um Zeitaufwand und Materialkosten zu verringern wurde die Methode der Elektroporation von MIN6-Zellen etabliert. Dafür wurden 18 µg DNA ( $6 \mu\text{g} / 10^6$  MIN6-Zellen) in 500 µl HEPES-KCl-Puffer (1fach) gemischt und in eine sterile vorgekühlte Elektroporationsküvette (4 mm Elektrodenabstand, Thermo Scientific) überführt. Die MIN6-Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben mit Accutase abgelöst, in DMEM aufgenommen und anschließend gezählt.  $3 \times 10^6$  Zellen wurden in 300 µl Cytomix resuspendiert, ebenfalls in die Küvette gegeben, vorsichtig gemischt und einer Spannung von 1,8 kV bei einer Kapazität von 25 µF ausgesetzt

(Cellject Uno, Thermo Scientific). Der Transfektionsansatz wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, anschließend in 9 ml DMEM-Medium (mit 10% FBS) aufgenommen und auf drei Zellkulturschälchen (3,5 cm) aufgeteilt, in denen sich mit Kollagen beschichtete Deckgläschen (s. Kapitel 3.2.2) befanden. Nach frühestens 48 Stunden wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Es zeigte sich eine mit der JetPei-Transfektionsmethode vergleichbare Transfektionseffizienz, und auch funktionell wurden keine Unterschiede zwischen den unterschiedlich transfizierten MIN6-Zellen festgestellt. Die Elektroporationsküvetten wurden nach Verwendung gereinigt und mit Ethanol 80% erneut sterilisiert.

#### **Cytomix**

25 mM	HEPES
120 mM	KCl
10 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,15 mM	CaCl <sub>2</sub>
2 mM	EGTA
5 mM	MgCl <sub>2</sub>

#### **HEPES-KCl-Puffer (10fach konzentriert)**

250 mM	HEPES (pH 7,69)
1,2 M	KCl

### **3.7.2. Stabile Transfektion**

Der Vorteil von stabil transfizierten Kulturen gegenüber transient transfizierten besteht darin, dass man immer wieder auf denselben Zellklon zurückgreifen kann, da das transfizierte Konstrukt in das Genom der Zellen integriert ist. Bei transient transfizierten Kulturen liegt das Plasmid häufig nur extrachromosomal vor, so dass es im Laufe der Zellteilungen meist verloren geht. Der transfizierte Charakter bei stabilen Kulturen geht also auch bei Kryokonservierung nicht verloren. Zudem variiert die Effizienz der transienten Transfektion häufig und auch Material- und Zeitaufwand können durch die Etablierung von stabilen Zellklonen reduziert werden. Zu diesem Zweck wurden  $5 \times 10^5$  MIN6-Zellen in 6 cm Zellkulturschälchen ausgesät, und am nachfolgenden Tag mit jetPEI transfiziert (s. Kapitel 3.7.1.1). Nach 24 Stunden erfolgte ein Medienwechsel, und nach weiteren 48 Stunden die Zugabe des Selektionsantibiotikums G418 (Genitacin) in einer Endkonzentration von 1,2 mg/ml. Die verwendeten Expressionsvektoren tragen die genetische Information

für eine Kanamycin/Geneticin-Resistenz, und nur solche Zellen, bei denen das Gen im Zellkern integriert vorliegt, können dem Selektionsdruck standhalten. Nach ca. drei Wochen Kultivierungsdauer in G418-haltigem Medium zeigten sich erste Kolonien. Diese wurden nach ca. weiteren 2 Wochen Wachstumszeit einzeln mit einer Pipettenspitze abgenommen und in eine 12-Well Zellkulturplatte überführt, in deren Wells jeweils ein Tropfen Accutase vorgelegt war. Der Zellhaufen wurde in den Tropfen eingebracht um dort zu dissoziieren. Nach ca. 10 Minuten wurde mit DMEM-Medium aufgefüllt und wie gewohnt weiter kultiviert. Nachdem die Zellen zu ca. 70% konfluent gewachsen waren, wurden sie abgelöst und die gesamte Zellmasse in ein 6 cm Zellkulturschälchen überführt. Auch hier wurden sie bei ca. 70% Konfluenz abgelöst und in eine 10 cm Zellkulturschale überführt. Nach erneuter Konfluenz wurde erstmals passagiert und dann die Erhaltungskultur mit einmal wöchentlicher Passagierung begonnen. Die stabil transfizierten Zellklone wurden unter dem Mikroskop auf das Vorhandensein der eingebrachten Fluoreszenzen kontrolliert, um dann in ausreichender Menge kryo-konserviert zu werden.

### **3.8. Lentivirale Infektion von MIN6-Zellen und primären $\beta$ -Zellen**

Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an das Kapitel 16.22, Current Protocols in Molecular Biology (2002), Generation of HIV-1-Based Lentiviral Vector Particles.

Ca. 50.000 MIN6-Zellen oder ca. 500 NMRI-Maus  $\beta$ -Zellen wurden auf mit Kollagen beschichteten Deckgläschen (s. Kapitel 3.2.2) in 3,5 cm Schälchen ausgesät und für mindestens 24 Stunden unter den jeweiligen Standardzellkulturbedingungen kultiviert (s. Kapitel 3.2.6 und 3.3.2). Am Tag der Infektion wurden die Viren (pLenti/hIns-EGFP, s. Kapitel 3.6) langsam auf Eis aufgetaut und gevortext. In einem Eppendorf-Gefäß wurde 1 ml des jeweiligen Zellkulturmediums vorgelegt und die Virenlösung in einer MOI (multiplicity of infection) von 5 zugefügt. Das besagt, dass für die Infektion einer Zelle fünf Viruspartikel zur Verfügung stehen. Durch den Zusatz von 6  $\mu$ g/ml Polybrene als Polykation kann die elektrostatische Abstoßung zwischen der negativ geladenen Zelloberfläche und den Viralen Vektoren verringert werden, und dadurch die Transduktionseffizienz erhöht werden (LANDAZURI et al. 2007). Die Lösung wurde zweimal kurz gevortext. Das Medium vom Vortag wurde abgesaugt und durch 1 ml frisches Medium ersetzt. Die Viren-Polybrene-Mischung wurde dann dazu

gegeben und das Schälchen vorsichtig geschwenkt. Nach weiteren 24 Stunden Kultivierung konnten die Zellen fluoreszenzmikroskopisch betrachtet werden. Es wurde auch probiert, mit diesem Vektor intakte Inseln zu transfizieren, es war jedoch keine granuläre Fluoreszenz von dem Hintergrund einer deutlichen Autofluoreszenz abzugrenzen.

### 3.9. Western Blot

#### 3.9.1. Verwendete Lösungen

##### Homogenisationspuffer

50 mM TEA, 5 mM DTT wurden in Wasser gelöst. Pro 50 ml des Puffers wurde eine Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche) zugegeben

##### SDS PAGE Probenpuffer (2fach konzentriert)

10 ml 1,5 M TRIS pH 6,8, 6 ml 20% SDS, 30 ml Glycerol, 15 ml 2-Mercaptoethanol und 1,8 mg Bromphenolblau wurden mit Wasser auf 100 ml ergänzt

##### SDS PAGE Probenpuffer (4fach konzentriert)

10 ml 3 M TRIS pH 6,8, 10 ml 20% SDS, 50 ml Glycerol, 15 ml 2-Mercaptoethanol und 3,6 mg Bromphenolblau wurden mit Wasser auf 100 ml ergänzt

##### Trenngelpuffer (4fach konzentriert)

1,5 M TRIS pH 8,8 und 0,4% SDS wurden in Wasser gelöst

##### Sammelgelpuffer (2fach konzentriert)

0,25 M TRIS pH 6,8 und 0,2% SDS wurden in Wasser gelöst

##### Laufpuffer / SDS PAGE Puffer (10fach konzentriert)

0,25 M TRIS pH 8,3 - 8,8, 1,92 mM Glycin und 1% SDS wurden in Wasser gelöst

##### Transferpuffer

25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol wurden in Wasser gelöst

##### TBST Puffer (10fach konzentriert)

150 mM NaCl, 10 mM TRIS und 1% Tween 20 wurden in Wasser gelöst

##### Ponceau S-Lösung (0,5% m/v)

0,5 g Ponceau S wurden in 1 ml Eisessig gelöst und auf 100 ml mit Wasser ergänzt.

### Blockierlösung

5% Milchpulver in TBST-Puffer

#### Trenngel 10%

Wasser	3 ml
4 x Trenngelpuffer	1,875 ml
30% Acryl-/Bisacrylamid-Mix	2,5 ml
TEMED	7,5 µl
10% APS	75 µl

#### Sammelgel 5%

Wasser	1,45 ml
2 x Sammelgelpuffer	2,5 ml
30% Acryl-/Bisacrylamid-Mix	1 ml
TEMED	3 µl
10% APS	60 µl

### **3.9.2. Herstellung von Gewebeextrakten**

Für die Durchführung der Western-Blot-Analysen wurden ca. 1000 MIN6-Pseudoinseln zweimal mit PBS gewaschen, bei 300 x g abzentrifugiert und in 300 µl Homogenisationspuffer aufgenommen. Durch viermal 4sekündiges Beschallen mit Ultraschall (Bandelin Sonopuls HD 2070) bei 50% Leistung wurden die auf Eis gekühlten Zellen aufgeschlossen. Zur Abtrennung von Zellbruchstücken und nicht vollständig aufgeschlossenen Zellen wurden die Homogenate für 30 Minuten bei 4 °C und 21000 x g (Heraeus Fresca 21) zentrifugiert. Der Proteingehalt des Überstandes wurde mittels Bradford-Methode bestimmt.

### **3.9.3. Bestimmung des Gesamtproteingehaltes nach Bradford**

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (BRADFORD 1976) mit Hilfe eines Kits der Firma Roth (Roti-Quant) vorgenommen. Hierbei bilden Proteine Komplexe mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliantblau, die über ihr Absorptionsmaximum bei 595 nm photometrisch quantifiziert werden können. Der Proteingehalt wurde anschließend über eine Kalibriergerade berechnet, die parallel zu den Proben mit Rinderserumalbumin (12,5 - 400 µg/ml PBS) erstellt wurde.

### **3.9.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt Proteine der Größe nach auf. Dabei binden die Proteine im Überschuss zugesetztes SDS und erhalten eine negative Ladung. Da diese zu ihrem Molekulargewicht proportional ist,



werden die SDS-Protein-Komplexe in der Gelmatrix der Molmasse nach aufgetrennt (SAMBROOK und RUSSELL 2001).

Bei der verwendeten Methode nach Lämmli (LAEMMLI 1970) werden die Proben zunächst in einem Sammelgel mit 5% Polyacrylamid konzentriert und anschließend im 10%igen Trenngel aufgetrennt. Es wurden vertikale Minigel-Elektrophoresekammern (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad, München) verwendet. Die Proben (20-50 µg Protein) wurden je nach Probenvolumen mit 2fach oder 4fach konzentriertem Ladepuffer versetzt und über drei Minuten bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 95 V über zwei Stunden in den mit Laufpuffer gefüllten Gelkammern. Als Molekulargewichtsmarker diente ein gefärbtes Proteingemisch bekannter Molekulargewichtsgrößen (peqLab, Erlangen).

### **3.9.5. Western-Blot-Transfer**

Das Proteinmuster des Gels wurde mit Hilfe eines *Semi-Dry*-Blotters (peqLab, Erlangen) auf eine PVDF-Membran (peqLab, Erlangen) übertragen. Hierbei diente der vorgefärbte Molekulargewichtsmarker zur Kontrolle der Transfereffizienz (SAMBROOK und RUSSELL 2001). Zunächst wurden sechs Whatman-Papiere (Chromatography paper 3 mm Chr, Whatman, Dassel) auf die Größe des Trenngels zugeschnitten. Das Trenngel und die Whatman-Papiere wurden danach in Transferpuffer äquilibriert, die ebenfalls auf Trenngelgröße zugeschnittene PVDF-Membran für fünf Minuten in Methanol aktiviert, und dreimal mit Wasser gewaschen. Nachfolgend wurde die PVDF-Membran für drei bis fünf Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde das „Blot-Sandwich“ auf der Anode folgendermaßen aufgebaut: Auf drei Whatman-Papiere folgten die PVDF-Membran, das Gel und schließlich weitere drei Whatman-Papiere. Der Boden des Blotters wurde mit ausreichend Transferpuffer bedeckt, die Apparatur geschlossen und die Stromstärke in Abhängigkeit von der Gelgröße gewählt. Pro Quadratcentimeter wurden ca. 3 mA angelegt. Die Dauer des Proteintransfers betrug 120 Minuten. Danach wurde die Membran kurz in TBST-Puffer eingelegt.

Die Effizienz des Transfers wurde durch 5minütiges Färben der PVDF-Membran mit Ponceau S-Lösung überprüft. Die Membran wurde anschließend vorsichtig mit Wasser entfärbt, 30 Minuten getrocknet, mittels CCD-Kamera dokumentiert und in TBST endgültig entfärbt.

### 3.9.6. Western-Blot-Detektion

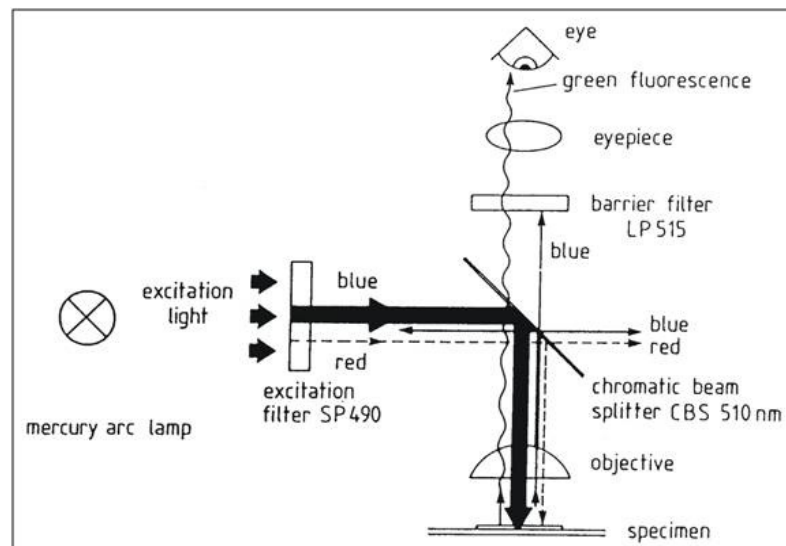
Nach dem Transfer wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung inkubiert und zweimal mit TBST gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (PDX-1 (A-17), Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), 1:750 verdünnt in TBST mit 1% Milchpulver über eine Stunde. Nach dreimaligem Waschen (5 - 10 Minuten) der Membranen mit Blockierungslösung folgte die einstündige Inkubation mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper (Esel anti-Ziege IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg), 1:2000 verdünnt in TBST mit 1% Milchpulver. Im Anschluss wurden die Membranen dreimal (5 - 10 Minuten) mit TBST-Puffer gewaschen.

Zur Detektion der gebundenen Zweitantikörper wurde das AceGlow Detektions-Kit der Firma PeqLab (Erlangen) eingesetzt. Die Peroxidase oxidiert das Luminol-Verstärkersubstrat. Durch Reaktion mit Peroxiden entsteht eine intensive Chemilumineszenz mit einem Emissionsmaximum bei 425 nm. Diese wurde in einem Chemilumineszenzsystem (Intas, Göttingen) detektiert. Die Expositionszeit lag bei 2 - 6 Minuten.

## 3.10. Fluoreszenzmikroskopie

### 3.10.1. Die Mikroskopfluorimetrie mit digitaler Bildverarbeitung

Die Fluoreszenzmikroskopie wird derzeit praktisch ausschließlich in der Form der Epifluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Im Epifluoreszenzmikroskop (PLOEM 1993) dient das Objektiv gleichzeitig auch als Kondensor im Anregungsstrahlengang. Ermöglicht wird dieser Strahlengang durch den dichromatischen oder auch Teilerspiegel. Ein solcher Spiegel reflektiert Licht, das kurzwelliger ist als seine Teilerkante, und lässt längerwelliges Licht passieren. In einem Winkel von  $45^\circ$  zum einfallenden Licht angebracht, reflektiert ein solcher Teilerspiegel das Anregunglicht zum Kondensor und lässt das vom Objektiv wieder gesammelte, längerwellige Fluoreszenzlicht zum Detektor (Auge, Photomultiplier, CCD Kamera) passieren. Dabei ist es prinzipiell unerheblich, ob das verwendete Mikroskop von aufrechter oder inverser Bauart ist. Falls gleichzeitig noch direkte Manipulation an Zellen vorgenommen werden sollen, wie es z.B. bei der Elektrophysiologie unerlässlich ist, werden inverse Mikroskope bevorzugt.



**Abb. 3.8 Strahlengang durch das Epifluoreszenzmikroskop (PLOEM 1993).** Als Lichtquelle wurde hier nicht eine Quecksilber-Hochdruckgasentladungslampe genutzt sondern eine Xenonlichtbogenlampe verwendet. Desweiteren erfolgte die Erzeugung monochromatischen Lichtes nicht wie hier dargestellt über einen Anregungsfilter, sondern über ein optisches Gitter (nähere Erläuterung im Text).

### **3.10.1.1. Mikrofluorimetrische Messung der fluoreszierenden Insulin-Fusionsproteine**

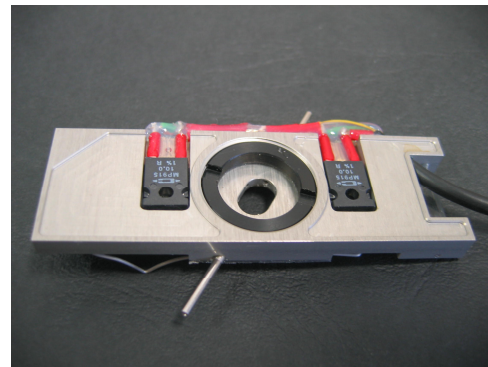
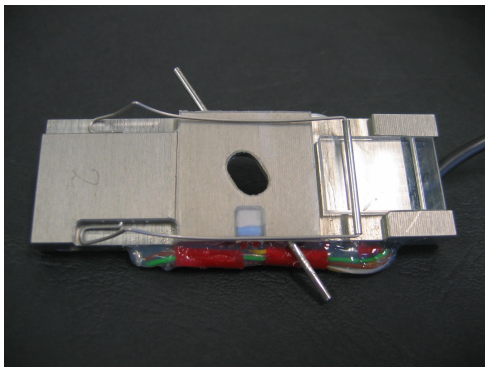
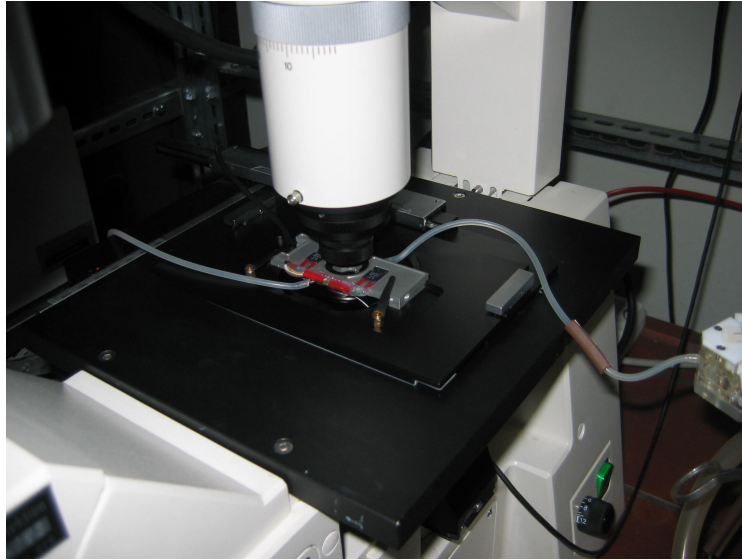
Nachdem sich herausgestellt hatte, dass der für die Fura-Fluoreszenz-Ratio Messungen (s.u., Kapitel 3.10.1.5) verwendete Messplatz für die Darstellung der fluoreszierenden Sekretgranula nicht hinreichend lichtstark ist, wurde ein zusätzlicher Messplatz mit den folgenden Komponenten zusammengestellt. Als Stativ diente ein inverses Mikroskop Zeiss Axiovert 135. Für die Fluoreszenzanregung wurde eine Xenonlichtquelle (Xe 75/2 in Leitz 100Z Lampenhaus) verwendet, die an einen programmierbaren Monochromator (Polychrome Junior, TILL Photonics, Gräfelfing) angeschlossen war. Die Einkopplung in den Auflichtstrahlengang des Mikroskops geschah mittels eines Quarzlichtleiters und eines Epifluoreszenzkondensors (TILL Photonics, Gräfelfing). Zunächst wurde ein älteres Leitz Fluoreszenzobjektiv (F 100x, 1,36 numerische Apertur,  $\infty/-$ ) verwendet, mit der Verwendung eines neuen Zeiss Objektivs (Planapochromat 63x, 1,40 numerische Apertur,  $\infty/0.17$ ) war die Lichtstärke deutlich zu steigern. Für die Anregung von grün fluoreszierenden Fusionsproteinen wurde folgender Filtersatz verwendet: HC-BS 495 (dichroitischer Spiegel) und HC-BP 520/35 (Bandpass-Sperrfilter), für die Anregung von rot fluoreszierenden Fusionsproteinen wurde analog HC-BS 562 (dichroitischer Spiegel) und HC-BP 593/40 (Bandpass-Sperrfilter) verwendet (beide Filtersätze von AHF Analysentechnik, Tübingen). Diese Filtersätze (HC = hard-coated) hatten sich gegenüber anderen vor allem hinsichtlich des Signal-Rausch-Verhältnisses als überlegen dargestellt.

Die Fluoreszenzemission wurde mit einer gekühlten slow scan CCD-Kamera (Pursuit, Diagnostics Instruments, Burroughs, MI, USA) registriert. Die notwendigen Belichtungszeiten betrugen anfänglich 120 s und waren durch die Verbesserungen am Messstand schließlich auf 1 s zu senken. Für die Herstellung von Fluoreszenzbildern in höchstmöglicher Auflösung waren bis zuletzt Belichtungszeiten bis zu 30 s erforderlich. Eine weitere Verminderung der Expositionsdauer war unter den gegebenen Bedingungen vor allem durch eine intensivere Fluoreszenzlichtquelle zu erreichen. Die Steuerung der CCD-Kamera erfolgte mit der zugehörigen Software (spot v 4.5, Diagnostic Instruments, Burroughs, MI, USA), die Lichtquelle wurde über das Programm TILL ADC v 1.01 (TILL Photonics, Gräfelfing) angesteuert. Aufgenommene Bilder wurden mit der offline-Version von MetaMorph V 7.0

(Molecular Devices) ausgewertet, und, falls für die Auswertung oder Darstellung erforderlich, mit dem Programm AutoDeblur 2D X1.4.0 (AutoQuant Imaging) nachbearbeitet. Als Umströmungskammer wurde eine temperierbare Variante der für die Verwendung an aufrechten Mikroskopen entwickelten Kammer verwendet (Abb. 3.10). Somit bildeten Kammer und Zuleitungen ein geschlossenes System. Das Deckgläschen wurde auf die mit Medium gefüllte Umströmungskammer gelegt, so dass die Seite mit den angewachsenen Zellen nach unten zeigte. Durch das Auflegen des Deckgläschens wurde die Umströmungskammer geschlossen. Mittels einer auf der abfließenden Seite der Kammer befindlichen peristaltischen Pumpe (Ismatec ISM597A, Wertheim-Mondfeld) wurde vorgewärmtes und mit Carbogen gesättigtes Medium aus einem Vorratsgefäß in die Kammer gesogen. Zusätzlich zur Temperierung der Kammer wurde auch das Plan-Apo Objektiv durch ein regelbares System (Tempcontrol mini, PeCon GmbH, Erbach) auf 36 °C angewärmt, so dass es nicht zu einem Wärmeabfluss kommen konnte.



**Abb. 3.9 Messplatz für die mikrofluirimetrische Bestimmung der fluoreszierenden Insulin-Fusionsproteine.** Als Stativ diente ein inverses Mikroskop Zeiss Axiovert 135, das mit einer gekühlten CCD-Kamera (Pursuit, Diagnostic Instruments) ausgestattet war. Die Fluoreszenzanregung erfolgte durch eine Xenonlichtquelle, die an einen programmierbaren Monochromator angeschlossen war (fehlt in der Abbildung). Eine peristaltische Pumpe wurde abflusseitig an die Umströmungskammer (s.u.) angeschlossen, und saugte im Wassermantel temperiertes Medium durch das System. Die Temperierung der umströmten Zellen wurde einerseits durch die Temperierbarkeit der Durchflusskammer bewirkt, andererseits aber auch durch eine Temperierung des federnden Anteils des PlanApochromat-Objektivs.



**Abb. 3.10 Temperierbare Umströmungskammer im geschlossenen Umströmungssystem.** Die Umströmungskammer ist ein gefräster monolithischer eloxierter Aluminium-Block, der durch zwei Peltier-Elemente temperiert werden kann. Durch Sensoren wird das genaue Einhalten der Temperatur sicher gestellt. Die Durchflusskammer hat eine Höhe von 2,2 mm und erhält einen Zufluss durch eine Stahl-Kanüle mit einem Durchmesser von 1,6 mm. Die Kammer wird auf beiden Seiten durch Deckgläschen geschlossen. Das Deckgläschen auf der Oberseite (links) hat einen Durchmesser von 25 mm und wird mit einem Federbügel gehalten, das Deckgläschen (Ø 19 mm) auf der Kammerunterseite (rechts) wird mit einem Schraubring an eine dicht schließende Teflon-Scheibe gepresst. Das Kammervolumen beträgt 100  $\mu\text{l}$ . Für die hier gezeigten Versuche wurde eine Durchflussgeschwindigkeit von 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  gewählt. Oben abgebildet ist das geschlossene Umströmungssystem. Rechts der Zulauf für temperiertes Umströmungsmedium, links der Ablauf aus der Kammer.

### 3.10.1.2. Permeabilisierung der Plasmamembran von MIN6-Zellen mit Digitonin

Zur Charakterisierung der subzellulären Lokalisation der Insulin-Fusionsproteine war es erforderlich, die Plasmamembran der Zellen zu permeabilisieren. Dafür wurde ein



Puffer verwendet, der 20 µg/ml Digitonin enthält. Digitonin ist ein Digitalis-Glycosid, das mit dem Cholesterol in Plasmamembranen Komplexe bildet, und auf diese Weise Poren ausformt.

Zusammensetzung des Digitonin-Puffers (pH 7,0):

25 mM	HEPES
125 mM	KCl
2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
5 mM	Bernsteinsäure
150 µM	EGTA
20 µg/ml	Digitonin

Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte in der in Abb. 3.10 beschriebenen Umströmungskammer. Der vorgewärmte oxygenierte Digitoninpuffer wurde in die Umströmungskammer gesogen bis es zum vollständigen Austausch des bis dahin in der Kammer befindlichen Mediums gekommen war. Die Pumpe wurde gestoppt und die Zellen für 10 - 30 Minuten der Digitoninwirkung ausgesetzt. Im Anschluss wurde wieder mit Krebs-Ringer-Medium umströmt und die nichtgranulären Strukturen für ca. eine Stunde ausgewaschen. Im Anschluss wurden die mikroskopischen Aufnahmen gemacht.

#### **3.10.1.3. Beladung von MIN6-Zellen mit Rhodamin123**

Zur selektiven Anfärbung der Mitochondrien wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin123 beladen. Die Durchführung erfolgte wie in 3.10.1.2 beschrieben. Das Rhodamin wurde dabei in einer Konzentration von 5 µg/ml dem Krebs-Ringer Umströmungsmedium zugesetzt. Nach 10 Minuten Einwirkungszeit wurde das Rhodamin-haltige Medium ausgewaschen. Dieser Vorgang dauerte ca. 15 Minuten. Nach vollständiger Entfernung des Farbstoffs wurden die mikroskopischen Aufnahmen gemacht.

#### **3.10.1.4. Beladung von insulinproduzierenden Zellen und NMRI-Maus-Inseln mit verschiedenen Fluoreszenzindikatoren**

Für die Bestimmung der cytosolischen Calciumkonzentration erfolgte nach einer Kultivierungsdauer von mindestens 24 Stunden bis maximal 72 Stunden auf



beschichteten Deckgläschen (s. Kapitel 3.2.2) die Beladung der MIN6-Zellen, primären  $\beta$ -Zellen oder NMRI-Maus-Inseln mit Fluoreszenzindikatoren direkt vor der Durchführung der Experimente. Die MIN6-Zellen und die  $\beta$ -Zellen wurden für 45 Minuten in Krebs-Ringer-Medium inkubiert, das den Indikator Fura-2/AM in einer Konzentration von 2  $\mu$ M enthielt (LENZEN und PECKMANN 2001). Die Inseln wurden für 50 Minuten in Krebs-Ringer-Medium inkubiert, das den Indikator Fura-PE3/AM ebenfalls in einer Konzentration von 2  $\mu$ M enthielt (RAVIER et al. 2002), (KJEMS et al. 2002). (Für detailliertere Ausführungen s. (WIENBERGEN 2006)).

#### **3.10.1.5. Mikrofluorimetrische Messung der cytosolischen Calciumkonzentration**

Als Standardverfahren für die Messung der intrazellulären Calciumionenkonzentration lässt sich die ratiometrische Messung des Fluoreszenzindikators Fura-2 bezeichnen, der von der Gruppe um Roger Tsien synthetisiert wurde (GRYNKIEWICZ et al. 1985). Fura-2 bindet mit einer funktionellen Gruppe, die dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA entspricht, freies Calcium wodurch sich die Fluoreszenzeigenschaften des Moleküls ändern. Hierbei ist die Eigenschaft, die den Gebrauch von Fura-2 populär gemacht hat, dass die Fluoreszenzintensität bei einer bestimmten Anregungswellenlänge mit dem Ausmaß der Calcium-Bindung zunimmt, bei einer längerwelligen Fluoreszenzanregung jedoch mit dem Ausmaß der Calcium-Bindung abnimmt. Das Anregungsspektrum von Fura-2 bei verschiedenen Calcium-Konzentrationen ergibt auf diese Weise eine Kurvenschar, die bei ca. 340 nm den größten Abstand zwischen hohen und niedrigen Calcium-Konzentrationen aufweist, bei ca. 360 nm sich in einem Punkt trifft und bei ca. 380 nm ein weiteres Maximum des Abstands zwischen hoher und niedriger Calcium-Konzentration aufweist, wobei hier jedoch die höhere Fluoreszenzintensität in Gegenwart niedriger Calcium-Konzentration vorliegt (GRYNKIEWICZ et al. 1985). Wird die bei 340 nm erzeugte Fluoreszenz durch die bei 380 nm erzeugte geteilt, so ist die nun erhaltene Größe, die Fluoreszenz-Ratio, von der Indikatorkonzentration unabhängig (zur genauen Herleitung s.(GRYNKIEWICZ et al. 1985)). Nachdem sich herausgestellt hat, dass die mit Fura-2 gemessene intrazelluläre Calcium-Konzentration keine einheitliche Größe ist (SIMPSON 1999), wird auf eine prinzipiell mögliche Kalibrierung häufig verzichtet und nur die Fura-2-Fluoreszenz-Ratio angegeben. Die das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion

komplexierenden Carboxylgruppen des Fura-Moleküls verhindern eine Membranpassage. Werden die Carboxylgruppen jedoch mit Acetoxymethylgruppen verestert (sog. AM-Ester), so ist der Indikator lipophil genug, um die Zellmembran passieren zu können. Im Cytosol werden die Esterbindungen durch unspezifische Esterasen gespalten und der nunmehr wieder polare Farbstoff kann nicht mehr aus der Zelle heraus diffundieren. Für die Beladung von isolierten Pankreasinseln hat sich eine Konzentration von Fura-PE3/AM von 2  $\mu\text{M}$ , eine Dauer von 50 Minuten und eine Beladungstemperatur von 37 °C als geeignet erwiesen.

Die abwechselnde Anregung der Fura-Fluoreszenz mit 340 und 380 nm wurde im für diese Versuche verwendeten Messstand dadurch erreicht, dass das Licht des Xenonlichtbogens auf zwei Quarzlichtleiter projiziert wurde, deren Eingang durch programmierbare Schnellverschlüsse (Uniblitz-Shutter, Vincent Associates, Rochester, NY, USA) gesperrt war. Durch die variabel einstellbare Winkelstellung zwischen diesen Quarzlichtleitern und einem Beugungsgitter wurden die Ausschnitte aus den Spektren verschoben, die vom Gitter auf den zum Mikroskop führenden Lichtleiter projiziert wurden. Das distale Ende dieses Lichtleiters war in dem Lampenhaus des Epifluoreszenzmikroskops (Leitz Orthoplan) fixiert. Als Epifluoreszenzkondensor diente das Leitz Ploemopak 2.1 Modul, das 4 Filterwürfel aufnehmen kann. Für die Messung der Fura-Fluoreszenz wurde ein dichroitischer Spiegel mit einer Teilerkante von 400 nm und ein Langpassfilter mit einer Kante von 460 nm verwendet. Auf den anregungsseitigen Bandpassfilter, der die Lichtstärke deutlich verminderte, konnte wegen der Lichtquelle verzichtet werden.

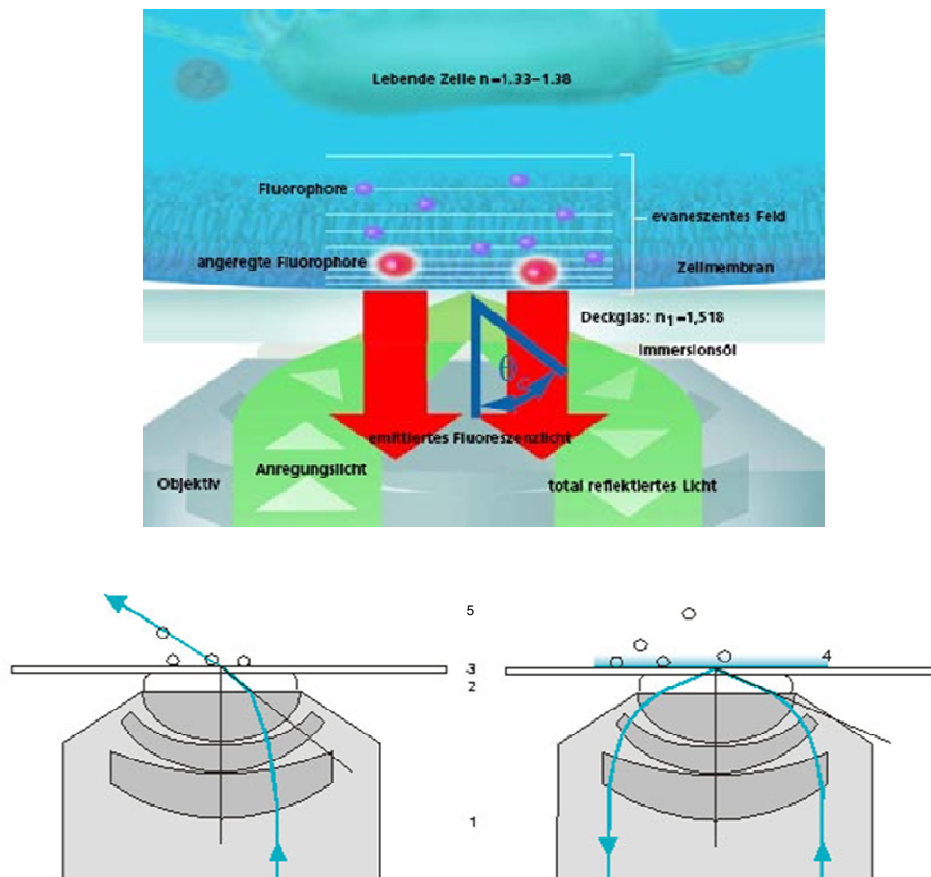
Da es sich bei dem verwendeten Orthoplan Mikroskop um ein aufrechtes Mikroskop handelte, mussten die Umströmungskammer und die Zuleitungen ein geschlossenes System bilden. Das Deckgläschen wurde auf die mit Medium gefüllte Umströmungskammer gelegt, so dass die Seite mit den angewachsenen, Fura-beladenen Zellen nach unten zeigte. Durch das Auflegen des Deckgläschens wurde die Umströmungskammer geschlossen. Mittels einer auf der abfließenden Seite der Kammer befindlichen peristaltischen Pumpe wurde vorgewärmtes Medium aus einem Vorratsgefäß in die Kammer gesogen. Die 340/380 nm Bildpaare wurden im Abstand von einer Minute aufgenommen. Als Objektiv wurde ein Zeiss Fluor (40x, 1,3 numerische Apertur,  $\infty/0.17$ ) verwendet, das auch bei 340 nm noch eine relativ hohe Transmission aufweist. Mittels einer slow-scan CCD Kamera wurden die

Fluoreszenzbilder bei 340 und 380 nm Anregung aufgenommen und nach Beendigung des Versuchs die Fluoreszenz-Ratio des Bildes durch Pixel pro Pixel Division berechnet (Focal-Software, TILL-Photonics, Gräfelfing).

### **3.10.2. TIRF-mikroskopische Messung der fluoreszierenden Insulin-Fusionsproteine**

Die Visualisierung von Prozessen, die nahe der Zellmembran lebender Zellen stattfinden, ist schwierig, da die für diesen Zweck notwendige Auflösung weder durch die Auflicht-Fluoreszenz noch durch konfokale Mikroskopie erreicht wird. Eine Technik, bei der nur die Fluorophore in einer dünnen Schicht angeregt werden ist die TIRF-Mikroskopie. Sie eignet sich hierfür besonders, da Prinzip bedingt Moleküle lediglich in einer Schicht von typischerweise 100 - 200 nm oberhalb des Deckglases angeregt werden können.

### 3.10.2.1. Das Prinzip der TIRF-Mikroskopie



**Abb. 3.11 Prinzip der TIRFM.** Schematische Darstellung der TIRF-Mikroskopie (oben). Unten links die schematische Darstellung des Strahlengangs unterhalb des kritischen Winkels; unten rechts unter den Bedingungen der Totalreflexion. 1: Objektiv, 2: Immersionsöl  $n = 1,518$ , 3: Deckglas  $n = 1,518$ , 4: Evaneszentes Feld, 5: Medium  $n$  ca.  $1,38$ . Abbildung adaptiert von <http://www.zeiss.com>

Wenn ein Lichtstrahl von einem optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium unter einem Winkel eintritt, der nach dem Snell'schen Brechungsgesetz größer ist als der sogenannte kritische Winkel kommt es zur Totalreflexion (d.h.  $\theta_2 = 90^\circ$ ).

$$n_1 \cdot \sin \theta_1 = n_2 \cdot \sin \theta_2$$

Für den Übergang von Deckglas ( $n_1=1,518$ ) zu Wasser ( $n_2= 1,33$ ) ergibt sich ein kritischer Winkel  $\theta_c$  von  $61^\circ$ . Unter Totalreflexion bildet sich am Übergang der beiden Medien eine stehende evaneszente (abklingende) Welle, deren Intensität

exponentiell mit dem Abstand zur Grenzfläche abnimmt. Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes ist definiert als der Abstand  $d$  von der Grenzfläche, in der die Energie des Lichtes auf  $1/e = 37\%$  des ursprünglichen Wertes abgefallen ist. Sie ist abhängig von dem Einfallswinkel und der Wellenlänge des verwendeten Lichtes. Aufgrund der Energieverteilung werden von der Grenzfläche weiter entfernte Fluorophore nicht angeregt. Es entsteht also ein dünner optischer Schnitt von ca. 100 - 200 nm Dicke und mit einem sehr hohen Signal/Hintergrund Verhältnis. Der Bildkontrast und die Auflösung in z-Richtung werden deutlich gesteigert.

Es ist mittlerweile auch möglich, das evaneszente Feld als Epifluoreszenz zu erzeugen. Unter Verwendung sehr hochaperturiger Objektive ( $NA > 1,45$ ) in Kombination mit einem speziell geführten Strahlengang lässt sich ein überkritischer Winkel einstellen, und es kommt zur Totalreflektion. Dadurch ist es möglich, auch mit herkömmlichen Epifluoreszenz-Lichtquellen, Strukturen im plasmamembrannahen Bereich hochauflösend darzustellen.

### **3.10.2.2. Durchführung der TIRF-Mikroskopie**

Für die TIRF-Mikroskopie wurde ein inverses Mikroskop (Olympus IX-70) verwendet, das mit einem Objektiv mit hoher numerischer Apertur (1.45 NA, Zeiss, 100x) ausgestattet war. Als Lichtquelle diente ein Argon Ionen Laser (Coherent, Innova 5). Die Bilder wurden mit einer von Metamorph (Universal Imaging Corporation) gesteuerten CCD-Kamera mit einer Frequenz von 2-5 Hz. aufgenommen. Alle Versuche wurden bei 35 bis 37°C und kontinuierlicher Umströmung der Zellen durchgeführt (ca. 1 ml/min). Diese Messungen wurden im Zilkha Neurogenetic Institute, Keck School of Medicine, USCA in Los Angeles durchgeführt.

### **3.11. Elektronenmikroskopische Darstellung der Insulin-Sekretgranula**

Inseln von NMRI Mäusen wurden, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, isoliert und jeweils 50 Inseln für 18 Stunden unter Standardzellkulturbedingungen kultiviert. Dem Zellkulturmedium waren je nach Versuchsbedingung 5 oder 10 mM Glucose und 100  $\mu$ M Efaroxan oder 500  $\mu$ M Tolbutamid zugesetzt. Die Inseln wurden im Anschluss in einer Lösung aus Paraformaldehyd (2%) und Di-Glutaraldehyd (2%) in Cacodylat-Puffer (0,1 M, pH 7,3) für die Elektronenmikroskopie fixiert. Nach einstündiger Inkubation mit Osmiumtetroxid (1%) wurden die Inseln in ein Epoxy-Harz eingebettet. Mit einem Ultramikrotom (Ultracut, Leica-Reichert-Jung) wurden 50 nm dicke Schnitte angefertigt, und diese auf ein Nickel-Gitter überführt. Dort wurden sie mit Uranylacetat und Bleicitrat angefärbt. Fünf mittelgroße Inseln (Durchmesser ungefähr 150  $\mu$ M) wurden ultrastrukturell untersucht. Die betrachteten Inseln enthielten 70 - 100  $\beta$ -Zellen und wurden unterschieden in intakte oder zerstörte Zellen. Für die Transmissions-Elektronenmikroskopie wurde ein Zeiss EM9 Elektronenmikroskop verwendet. Es wurden jeweils zwei unabhängige Inkubationen pro Versuchsbedingung durchgeführt. Diese Messungen wurden im Institut für Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

### **3.12. Immunohistochemische Darstellung von EGFP und C-Peptid in MIN6-Zellen**

Zur Antikörperfärbung von EGFP und C-Peptid wurden  $3 \times 10^6$  Insulin-EGFP stabil transfizierte MIN6-Zellen und als Kontrolle  $3 \times 10^6$  untransfizierte MIN6-Zellen in Paraformaldehyd (4% in PBS) für die Immunohistochemie fixiert, nach Paraffineinbettung und Schneiden von Semidünnschnitten wurde das Paraffin durch eine Serie von Waschschritten in einer Alkohol-Serie abnehmender Konzentrationen entfernt. Die Antikörper-Reaktion von EGFP- und C-Peptid-Antikörper wurden durch einen sekundären Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper durch Umsatz von Diaminobenzidin sichtbar gemacht (LIDDELL 1996). Diese Messungen wurden im Institut für Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

### 3.13. Dynamische Messung der Insulinsekretion

#### 3.13.1. Durchführung der Perifusion

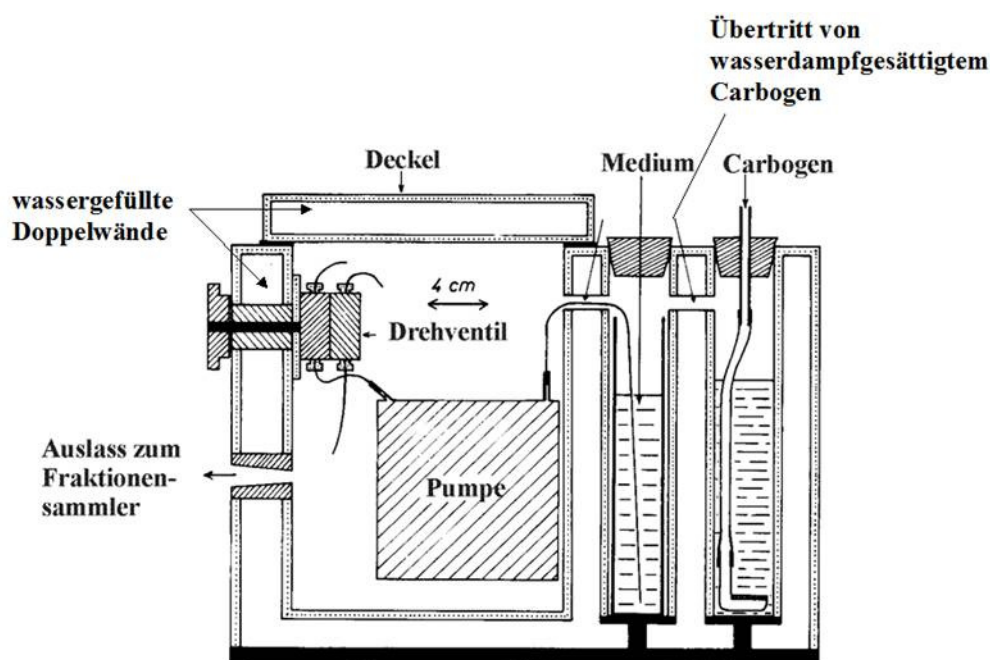
Zur Durchführung der Perifusionen wurde eine Modifikation des 1977 von PANTEN et al. beschriebenen Mikroperifusionssystems benutzt (PANTEN et al. 1977). Der Perifusionsapparat (Abb. 3.12) wurde mindestens 90 Minuten vor Beginn des Begasens mit Carbogen auf 37°C vorgeheizt. Damit war nach dem Einbringen der Inseln in die Perifusionskammer -bei geschlossenem System- eine konstante Temperatur von 37°C während der gesamten Versuchsdauer gewährleistet. Nach Erreichen der Temperatur von 37°C im Perifusionssystem wurde der Apparat fortlaufend bis zum Ende des Versuchs von Carbogen durchströmt. Die Messzylinder mit den Kontroll- und Test-Lösungen wurden in das Gerät hineingestellt. Vor Versuchsbeginn wurden Kontroll- und Test-Lösungen nochmals für 30 Minuten mit Carbogen begast.

Vor der Isolierung der Inseln wurde die Perifusionskammer vorbereitet: Mit einer Deckglaspinzette wurde ein Filter (SMWP01300, Fa. Millipore) genau in die Rille am Kammerkonus eingelegt, ohne dabei das Filter zu verletzen, ein Silikon-Dichtungsring (SX0001301, Fa. Millipore) aufgelegt und der ableitende Teil der Kammer aufgesteckt, ohne Ring oder Filter zu verschieben. Dann wurde eine 5 ml-Spritze über einen Kunststoffkonus an den Ableitschlauch angeschlossen und die Perifusionskammer mit Hilfe der Spritze luftblasenfrei mit Krebs-Ringer-Medium (3.2.1) gefüllt. 50 isolierte Inseln wurden in die vorbereitete Kammer pipettiert und sanken auf das Filter, ohne dass Luftblasen entstanden.

Der zur Perifusionskammer führende Schlauch wurde unter Verwendung einer Peristaltik-Pumpe (LKB, Multiperpex) mit Kontrollmedium luftblasenfrei gefüllt und auf die mit den Inseln befüllte Perifusionskammer geschraubt. Diese wurde anschließend im Inneren des Perifusionsapparates mit Klebeband befestigt. Der Ableitschlauch wurde nach Entfernen der 5 ml-Spritze am Fraktionssammler (Cygnet, Fa. Isco, USA) justiert.

Nach dem Einschalten der Pumpe wurden die Inseln in der Kammer vom Kontrollmedium umströmt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Das Perfusat der ersten 20 Minuten wurde verworfen. Das Perfusat der folgenden 40 Minuten wurde in fünf Fraktionen von je acht Minuten Dauer (entsprechend 8 ml Volumen)

gesammelt. Beim Wechsel auf die Testsubstanzen wurde der zur Perifusionskammer führende Schlauch in den zweiten Messzylinder mit dem entsprechenden Medium umgehängt. Die Fraktionierung richtete sich nach den zu erwartenden Reaktionen, d.h. kurz nach einem Wechsel wurde mit höherer Zeitauflösung (zwei Minuten), ansonsten mit geringerer Zeitauflösung (fünf oder acht Minuten) fraktioniert. Jeweils 1 ml der gesammelten Fraktionsvolumina wurde in Eppendorf-Reagiergefäßen bis zur Verwendung im ELISA-Test tiefgefroren.



**Abb. 3.12 Modell des Mikroperifusionssystems (Seitenansicht) nach (PANTEN *et al.* 1977).** Das System verfügt über doppelte Wände, die von 37°C warmem Wasser durchströmt werden. Bei den durchgeführten Versuchen wurde eine von der Abbildung abweichende Anordnung der Pumpe benutzt, die vor die Perifusionskammer (hier nicht dargestellt) geschaltet ist. Für weitere Details s. Text.

Nachdem die Perifusionskammer vom Schlauchsystem abgeschraubt und geöffnet worden war, wurde das Filter mit den perifundierten Inseln entfernt und alle Einzelteile der Kammer mit Wasser gereinigt und danach bei 60°C getrocknet. Das Schlauchsystem wurde 30 Minuten mit Wasser durchspült, anschließend durch ebenso langes Durchsaugen von Luft getrocknet. Einmal pro Woche bzw. nach Beendigung einer Testserie wurde das Schlauchsystem vor der Spülung mit Wasser mit Ethanol 70% gespült. Bei Notwendigkeit wurde der Perifusionsapparat innen und außen mit Ethanol 70% gereinigt.



### 3.13.2. Bestimmung des Insulingehalts

Der Insulingehalt der Proben wurde mittels eines enzymatischen Immunoassays (ELISA) bestimmt (Rat Insulin ELISA, Fa. Mercodia, Uppsala, Schweden). Dieser ELISA-Test funktionierte nach dem so genannten Sandwich-Prinzip: (ENGVALL und PERLMAN 1971), (ENGVALL et al. 1971). Die Mikrotiterplatte enthält einen monoklonalen Insulinantikörper, an den das Insulin aus der Probe binden kann. Zum Inkubationsansatz wird ein zweiter monoklonaler Insulinantikörper gegeben, der an eine andere antigene Determinante des Insulinmoleküls bindet („Sandwich“). Dieser zweite Antikörper ist mit dem Enzym Peroxidase konjugiert. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 20° C und einer gleichmäßigen mechanischen Bewegung von 285 Umdrehungen pro Minute werden ungebundene Anteile des mit Peroxidase konjugierten Antikörpers durch Waschen entfernt. Anschließend wird das Substrat 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin zum Ansatz pipettiert. Das Substrat wurde durch die antikörpergebundene Peroxidase zu einer gelblichen Verbindung oxidiert. Die Absorption des gebildeten gelben Farbstoffs wird bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt (Viktor<sup>2</sup> Wallac 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer). Der Insulingehalt der Proben wurde unter Verwendung der Software GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, California, USA) durch Aufstellung einer Standardkurve (Polynom zweiten Grades) errechnet. Dazu wurden für jede Mikrotiterplatte Insulinstandards mit 0 µg/l, 0,15 µg/l, 0,40 µg/l, 1,00 µg/l und 5,50 µg/l parallel mit den Proben inkubiert. Die Messung der Insulinstandards erfolgte als Doppelbestimmung. Proben, die mehr als 5,5 µg/l Insulin enthielten, wurden mit Nullstandard verdünnt. Keine der eingesetzten Testsubstanzen beeinflusste die Insulinmessung.

### 3.13.3. Datenauswertung

Die erhaltenen Insulinkonzentrationen mit der Einheit [µg/l] wurden unter Verwendung der Flussgeschwindigkeit (1 ml/min) und der Zahl der eingesetzten Inseln in die Sekretionsrate mit der Einheit [pg/min x Insel] umgerechnet.

Die Ergebnisse sind angegeben als arithmetische Mittelwerte der freigesetzten Insulinmengen in pg/min x Insel ± SEM für n unabhängige Experimente in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten.

### **3.14. Statische Messung der C-Peptid- und Insulinsekretion in MIN6-Pseudoinseln**

#### **3.14.1. Probengewinnung**

$5 \times 10^5$  MIN6-Zellen wurden in 3,5 cm Zellkulturschälchen für 24 Stunden in DMEM (high glucose) unter Standard-Zellkulturbedingungen kultiviert. Es folgte eine 1,5 stündige Äquilibration in 1 ml Krebs-Ringer-Medium mit 3 mM Glucose. Das Medium wurde abgenommen (1. Probenentnahme, Vorinkubation) und durch 1 ml frische Krebs-Ringer-Lösung mit 3 mM Glucose ersetzt. Nach 20 minütiger Inkubation erfolgte ein zweiter Medienwechsel (2. Probenentnahme), bei dem die Glucosekonzentration auf 30 mM erhöht wurde. Nach weiteren 20 Minuten wurde das Medium getauscht (3. Probenentnahme) gegen Krebs-Ringer-Lösung mit 30 mM Glucose und 40 mM KCl. Das Medium wurde nach weiteren 20 Minuten ein letztes Mal abgenommen (4. Probenentnahme), die im Schälchen anhaftenden Zellen abgeschabt und in Krebs-Ringer-Lösung (3 mM Glucose) aufgenommen. Die Zellen wurden suspendiert und auf Eis durch viermal 4sekündiges Beschallen mit Ultraschall (Bandelin Sonopuls HD 2070) bei 50% Leistung aufgeschlossen. Zur Abtrennung von Zellbruchstücken und nicht vollständig aufgeschlossenen Zellen wurden die Homogenate für 30 Minuten bei 4°C und 21000 x g (Heraeus Fresca 21) zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und bei -20°C gelagert. Die Proben für die Insulinbestimmung wurden vor der Gehaltsbestimmung mittels ELISA 1:50 verdünnt (Lysate 1:500), und die Proben für die C-Peptid-Bestimmung in der Vakuumzentrifuge (Sigma Zentrifugenbau Osterode) bis zur Trockne eingedampft und in 105 µl Wasser resuspendiert (auch die Lysate), so dass sich dadurch eine ca. 10fache Konzentrierung der Proben ergab.

#### **3.14.2. Bestimmung des C-Peptid-Gehalts**

Der Gehalt an humanem C-Peptid wurde mittels ELISA bestimmt (C-peptide ELISA specific, Fa. Mercodia, Uppsala, Schweden). Dieser ELISA funktioniert wie der Insulin ELISA (s. Kapitel 3.13.2) auch nach dem Sandwichprinzip, nur dass hier zwei monoklonale anti-C-Peptid-Antikörper verwendet werden. Die Durchführung erfolgte exakt nach Herstellerangaben. Der C-Peptid-Gehalt wurde wie in 3.13.2 für das

Insulin beschrieben errechnet. Die C-Peptid-Standardkurve ergab sich aus der Regression (Polynom zweiten Grades) der ermittelten Absorptionen folgender C-Peptid-Standards: 0,0 pmol/l, 115 pmol/l, 360 pmol/l, 1390 pmol/l, 2660 pmol/l und 4260 pmol/l. Für die Darstellung der Ergebnisse wurde die Einheit pmol/l in µg/l umgerechnet. Dabei entsprechen 331 pmol/l 1 µg/l C-Peptid.

### **3.14.3. Bestimmung des Insulin-Gehalts**

Der Insulin-Gehalt der Proben wurde wie in 3.13.2 beschrieben bestimmt.

## **3.15. Bestimmung von ATP und ADP in NMRI-Maus-Pankreasinseln**

### **3.15.1. Test-Prinzip der luminometrischen Bestimmung**

Die Bestimmung des ATP- und ADP-Gehaltes in isolierten Maus-Pankreasinseln erfolgte in Anlehnung an das von der Arbeitsgruppe um Henquin beschriebene Verfahren (DETIMARY *et al.* 1996b). Es wurde der ATP BIOLUMINESCENT ASSAY KIT (FL-AA) der Firma Sigma eingesetzt. Der bestand aus dem ATP ASSAY MIX (FL-AAM), dem ATP ASSAY MIX SOLUTION BUFFER (FL-AAB) und dem ATP STANDARD (FL-AAS). Aus ATP und Luciferin entstehen bei Anwesenheit von Magnesium-Ionen und unter Katalyse durch Luciferase das Adenyl-Luciferin und Pyrophosphat. Dieses reagiert mit Sauerstoff unter Lichtemission zu Oxyluciferin, AMP und CO<sub>2</sub>. Die freigesetzte Lumineszenz ist dabei proportional zum ATP-Gehalt in den Proben.

Der ADP-Gehalt wurde indirekt bestimmt nach Umwandlung des ADP zu ATP durch die Pyruvatkinase-Reaktion. Die Pyruvatkinase katalysiert die Bildung von ATP und Pyruvat aus ADP und Phosphoenolpyruvat. Die Differenz zwischen dem direkt messbaren ATP und dem nach enzymatischer Umwandlung messbaren ATP ergibt den ADP-Gehalt.

### 3.15.2. Verwendete Lösungen

#### Krebs-Ringer-Lösung

s. Kapitel 3.3.1

#### Trichloressigsäure (TCA)

15%ige wässrige Lösung

#### Neutralisierpuffer

20 mM HEPES und 3 mM  $\text{MgCl}_2$  wurden in Wasser gelöst und der pH-Wert mit 1 N-KOH auf 7,75 eingestellt. Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert.

#### ATP-Stammlösung zur Erstellung der ATP-Standardkurve

Der im Kit enthaltene ATP-Standard (FL-AAS) wurde mit 10 ml Wasser verdünnt und in 100 µl Aliquots bei -20 °C aufbewahrt. 100 µl enthielten  $2 \times 10^{-8}$  mol ATP.

#### ADP-Stammlösung zur Erstellung der ATP+ADP-Standardkurve

8,544 mg Adenosindiphosphat-Monokaliumsalz wurden in 100 ml Wasser gelöst und in 100 µl Aliquots bei -20 °C aufbewahrt. 100 µl enthielten  $2 \times 10^{-8}$  mol ADP.

#### Reaktionsmedium für die ATP-Bestimmung

45 µl Krebs-Ringer-Lösung (s. Kapitel 3.3.1) mit 5 mM Glucose wurden mit 300 µl Neutralisierpuffer gemischt.

#### Reaktionsmedium für die ATP+ADP-Bestimmung

45 µl Krebs-Ringer-Lösung (s. Kapitel 3.3.1) mit 5 mM Glucose werden mit 300 µl Neutralisierpuffer gemischt. Der Neutralisierpuffer enthielt in diesem Fall 2,3 U/ml Pyruvatkinase und 1,5 mM Phosphoenolpyruvat.

#### Assay Mix

Das lyophilisierte Pulver des Assay Mixes aus dem ATP-Biolumineszenz-Kit wurde in 5 ml Wasser gelöst und in Aliquots bei -20 °C eingefroren. Für die Versuche wurde der Assay Mix im Verhältnis 1:35 mit Assay Mix Dilution Buffer verdünnt. Die

Verdünnung diene der Einstellung des Assays auf den gewünschten ATP-Bestimmungsbereich (ca. 4 nmol/l bis 4 µmol/l).

### **3.15.3. Durchführung**

#### **3.15.3.1. Inkubation und Extraktion**

Es wurden Parallelinkubationen von Probe und Kontrolle durchgeführt. Zur Vorbereitung der Inkubation wurden zwei Schraubdeckelgefäße mit 1,5 ml Wasser gefüllt, für fünf Minuten mit Carbogen begast und im Wasserbad bei 37°C temperiert. Anschließend wurden wie in Kapitel 3.3 beschrieben Maus-Pankreasinseln isoliert, vom umliegenden Gewebe befreit und in Krebs-Ringer-Medium mit Albumin (s. Kapitel 3.3.1) aufgenommen. Je 15 Inseln wurden mit 50 µl Krebs-Ringer-Medium ohne Albumin entweder direkt in 1,5 ml Eppendorf-Reagiergefäße oder, falls vorgesehen, vorher für eine Inkubation über Nacht in 3,5 cm Zellkulturschälchen mit RPMI1640-Medium überführt. Die Medien enthielten je nach Versuchsserie verschiedene Glucosekonzentrationen oder Testsubstanzen. Die Eppendorf-Gefäße wurden mit geöffnetem Deckel in die vorbereiteten Schraubdeckelgefäße gestellt und für eine Minute mit Carbogen überblasen. Darauf folgte eine 45minütige Inkubation bei 37°C im Schüttelwasserbad (Schüttelstellung 7, Fa. Köttermann). Dieser Inkubationsschritt entfiel bei über Nacht kultivierten Inseln. Nach dieser Inkubation wurden 300 µl des Überstandes abgenommen und verworfen. Die restlichen 200 µl inklusive der 15 Inseln wurden mit 100 µl eiskalter Trichloressigsäure (TCA) versetzt. Dadurch wurden Enzyme denaturiert und die Nucleotide extrahiert. Die Proben wurden für eine Minute gevortext und für fünf Minuten in Eiswasser gestellt. Die gefällten Proteine wurden im Anschluss durch Zentrifugieren für drei Minuten bei 4°C und 10.000 x g abgetrennt (Biofuge primo R, Fa. Heraeus). 240 µl des Überstandes wurden abgenommen und zur Extraktion der TCA dreimal mit je 900 µl Diethylether ausgeschüttelt. Der Ether war im Vorfeld mit Wasser gesättigt worden. Die Proben wurden mit 240 µl Neutralisierpuffer neutralisiert, und 200 µl Aliquots bei -70°C eingefroren.

### **3.15.3.2. ATP- und ADP-Bestimmung**

#### **Erstellung der Standardkurven**

Für die Bestimmung von ATP und der Summe von ATP und ADP wurden zwei gesonderte Standardkurven aufgenommen, jeweils unter Verwendung der entsprechenden Stammlösung. Ausgehend von der Konzentration  $2 \times 10^{-8}$  pmol ATP wurden die Stammlösungen so verdünnt, dass die resultierende Standardkurve einen Kalibrierbereich von 3-300 pmol ATP umfasste. Die Verdünnung erfolgte mit Wasser. Um aber möglichst gleiche und vor allem optimale Reaktionsbedingungen für die eigentliche luminometrische ATP-Bestimmung zu schaffen, wurden 5 µl jeder einzelnen Standard-Verdünnung nochmals mit 345 µl Reaktionsmedium vermischt. Von diesen 350 µl wurden 100 µl/Well vermessen. Die einzelnen Verdünnungen der ATP+ADT-Standardkurve wurden vor der eigentlichen Messung zur enzymatischen Umsetzung des ADP zu ATP für 45 Minuten bei 37°C inkubiert.

#### **Bestimmung der ATP-Konzentrationen**

Zur Bestimmung des ATP-Gehalts wurden 50 µl des in Kapitel 3.15.3.1 gewonnenen Proben-Aliquots mit 300 µl Reaktionsmedium für die ATP-Bestimmung gemischt und nach Inkubation für 45 Minuten im Eisbad vermessen.

Zur Bestimmung des ATP+ADP-Gehalts wurden weitere 50 µl des in Kapitel 3.15.3.1 gewonnenen Aliquots mit 300 µl Reaktionsmedium für die ATP+ADP-Bestimmung gemischt und vor der Messung zur enzymatischen Umsetzung des ADP zu ATP für 45 Minuten bei 37°C inkubiert.

Jeweils 100 µl der Proben bzw. Standards wurden in Doppelbestimmung in Wells einer Mikrotiterplatte (Lumitrac 200, Nr. 655 075, Fa. Greiner) pipettiert und der Gehalt an ATP luminometrisch im Photometer (Viktor<sup>2</sup> Wallac 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer) bestimmt. Die Messung erfolgte pro Well und begann mit der Zugabe von 100 µl Assay Mix mittels eines Dispensers. Nach kurzzeitigem Schütteln und einer Sekunde Wartezeit wurde die Lumineszenz über 10 s gemessen. Die gemessene Lumineszenz wurde in counts per second angegeben.

### **3.15.3.3. Darstellung der Ergebnisse**

Für die Auswertung wurden die Mittelwerte der Doppelbestimmungen verwendet. Sowohl zur Ermittlung des ATP-Gehalts als auch der Summe des ATP- und ADP-Gehalts der Proben wurde jeweils eine Standardgerade durch lineare Regression erstellt. Der ADP-Gehalt ergab sich aus der Differenz des ATP- plus ADP-Gehalts (aus den Proben mit Pyruvatkinase-Zusatz) und des reinen ATP-Gehalts (aus den Proben ohne Pyruvatkinase-Zusatz). Die anhand der Standardgeraden ermittelten Werte in pmol Nucleotid pro Well wurden umgerechnet auf pmol Nukleotid pro Insel. Im Ergebnisteil sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n Einzelversuchen angegeben.

## **3.16. Die Patch-Clamp-Technik**

### **3.16.1. Aufbau des Messstands**

Zum Messstand gehörten:

- EPC 7 Patch-Clamp-Verstärker (HEKA)
- EPC 7 Vorverstärker mit Pipettenhalter
- Patch-Clamp-Software (pClamp 6.0.3)
- Hydraulischer Narishige-Mikromanipulator (XYZ-Kombination)
- Zeiss Axiovert 10 Mikroskop
- Schwingungsgedämpfter Messtisch (LT-100/80-A4SISA, Barry Controls)
- Pentium I Rechner

Mit der Patch-Clamp-Technik lassen sich sehr kleine elektrische Ströme (pA-Bereich) und Spannungen messen. Diese Signale werden häufig von elektrischem Hintergrundrauschen überlagert. Mit Hilfe eines Faraday-Käfigs ließ sich das Rauschen im niederfrequenten Bereich (50 Hz/Netzbrummen) reduzieren. Auf einem schwingungsgedämpften Tisch befanden sich Mikroskop, Zellbad und Mikromanipulator mit Pipettenhalter. Das inverse Mikroskop (Zeiss-Axiovert 10) wurde benötigt, um die Patch-Pipette an die zu messende Zelle heranzuführen.

In diesem Messstand wurden die Testsubstanzen mit der Badlösung an die Zellen gebracht. Die Badlösung wurde mittels Schwerkraft in das Zellbad geführt und mittels

Wasserstrahlvakuum abgesaugt. Der Wechsel der Lösungen erfolgte mit einem Vierwegehahn (Stämpfli-Hahn). Zur elektrischen Isolation des Bads diente je eine Glastropfkammer vor dem Stämpfli-Hahn und nach der Absaugkanüle. Das Zellbad bestand aus einem 35 mm Petrischälchen, in dessen Mitte die zu messenden Zellen angewachsen waren. In dieses Schälchen wurde ein runder Plexiglasblock gesetzt, der konisch ausgebohrt war, so dass sich eine zentrale Öffnung ergab, in der sich die am Petrischälchen angewachsenen Zellen befanden. Weiterhin waren in den Flanken des Plexiglasblocks drei Aussparungen für den Badzulauf, die Referenzelektrode und für die Absaugung gefräst.

Die Patch-Pipetten wurden aus mittelhartem Borosilikatglas hergestellt. Die Kapillaren wurden aus Glasmeterware auf eine Länge von 7,5 cm zugeschnitten. Aus den so vorbereiteten Glaskapillaren wurde mit Hilfe des vertikalen Pipettenziehgerätes (L/M-3P-A; List Electronics) in einem zweiphasigen Ziehvorgang die Patch-Pipetten hergestellt. Das Ergebnis waren zwei einzelne Pipetten mit identischen Dimensionen. Der Strom betrug im ersten Ziehvorgang 22 A und beim zweiten Ziehvorgang 14 - 15 A. Der zweite Ziehvorgang war für den Durchmesser der Pipettenspitze ausschlaggebend. Der Strom des zweiten Ziehvorgangs mußte so eingestellt werden, dass die Pipettenspitzen einen Durchmesser von 1 - 2  $\mu\text{m}$  hatten. Der Widerstand, der zu messen war, wenn die mit der Pipettenlösung gefüllten Pipetten in Zellbad eintauchten, lag zwischen 3 und 8 Megaohm. Um eine Verletzung der Zellmembran durch eine scharfe Abrisskante an der Pipettenspitze zu verhindern, wurden die Pipettenspitzen hitzepoliert. Zudem wurden nach Polieren höhere Abdichtwiderstände erreicht. Die Pipetten sollten innerhalb von 2 - 3 Stunden nach Herstellung benutzt werden.

Die Pipetten wurden je nach Messkonfiguration mit der erforderlichen Lösung gefüllt. Um das Füllen möglichst luftblasenfrei zu gewährleisten, wurde die Pipettenspitze in einen mit Pipettenlösung gefüllten Behälter gehalten, so dass sich die ersten 1-2 mm der vorderen Spitzenverengung über Kapillarkräfte füllten. Danach wurde die restliche Lösung mittels einer 1 ml Spritze, plus Sterilfilter und eines schmalen Kunststoffschlauchs in die Pipette gespritzt, bis diese etwa zu einem Drittel gefüllt war. Etwaige Luftblasen konnten durch vorsichtiges Beklopfen der Pipette gelöst werden.



Die Pipettenlösung (pH 7,15) enthielt:

140 mM	KCl
1 mM	MgCl <sub>2</sub>
2 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	EGTA
5 mM	HEPES

Die Extrazellulärlösung (EZ, pH 7,4) für den cell-attached Modus enthielt:

140 mM	NaCl
5,6 mM	KCl
2,6 mM	CaCl <sub>2</sub>
1,2 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	HEPES

### 3.16.2. Versuchsdurchführung

Aus dem Brutschrank wurden die 35 mm Kulturschälchen mit dem zu untersuchenden Zellmaterial entnommen und das Zellkulturmedium abpipettiert. Das Petrischälchen wurde in die Halterung auf dem Objektisch gesetzt. Zulauf des Badmediums, Absaugung und Agarbrücke für die Badelektrode wurden in ihre jeweiligen Aussparungen des Einsatzes positioniert und über Magnete fixiert. Über den Zulauf wurde Extrazellulärlösung zugeführt und mit dem Anstellen der Absaugvorrichtung ein gleichmäßiger Fluss der Badperfusion sichergestellt. Der Vorverstärker samt Pipette wurde um etwa 45° abgesenkt und mit dem Grobmanipulator soweit herabgelassen, dass die Pipettenspitze in die Badlösung eintauchte. Im Oszilloskop war das Eintauchen an einem rechteckigen Strompuls als Antwort auf den Testpuls (eine rechteckförmige Änderung des Pipettenpotentials) zu erkennen. Nach Berühren der Zellmembran, erkennbar an der Abnahme der Stromantwort auf den Testpuls, wurde ein Sog an der Pipettenspitze angelegt. Nun sollte der Widerstand, ablesbar vom Monitorfenster des Pulse Programms, rasch vom Megaohmbereich in den Gigaohmbereich ansteigen. Dann wurde der Sog wieder weggenommen. Die nachfolgenden Schritte wurden je nach gewünschter Messkonfiguration über die pClamp-Software gesteuert. Sämtliche Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

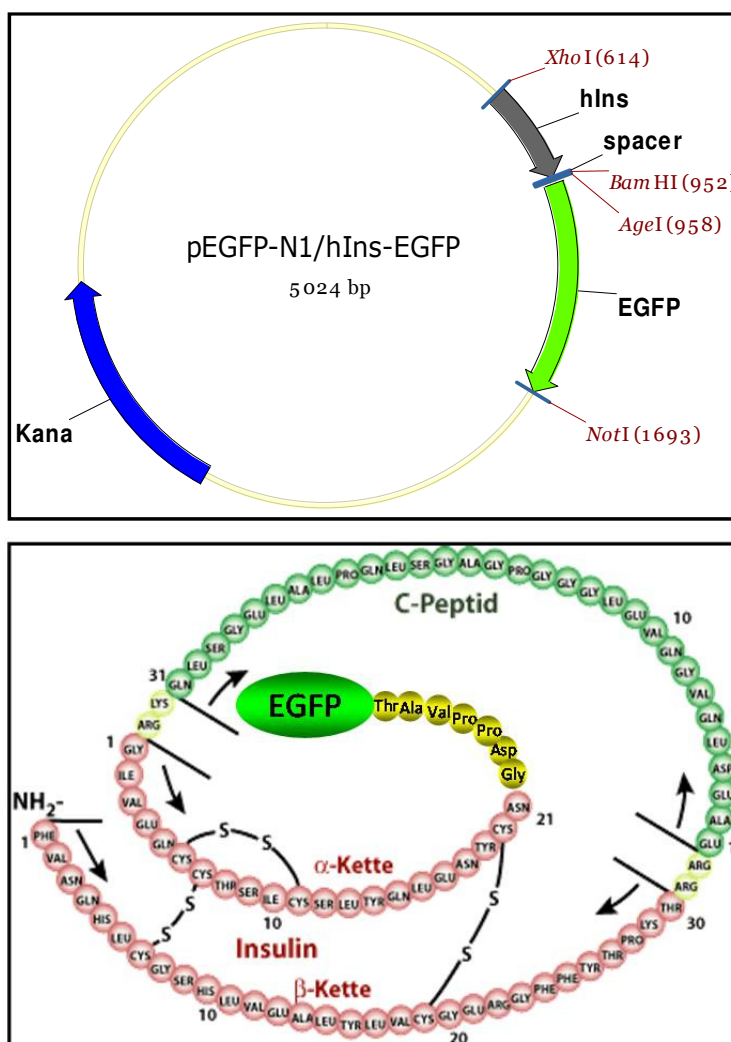
Sollten Einzelkanalmessungen durchgeführt werden, oder war die Intaktheit der Zellen von Bedeutung, so wurde die cell-attached Konfiguration der Patch-Clamp-Technik verwendet (HAMILL *et al.*, 1981). Diese Konfiguration ist mit der oben beschriebenen Herstellung eines Gigaohm-seals bereits erreicht. Alle cell-attached Versuche wurden bei einem Pipettenpotential von 0 mV durchgeführt. Die  $K_{ATP^-}$

Kanalaktivität wurde mit der Halbamplituden-Schwellenwerttechnik (COLQUHOUN und SIGWORTH 1995) unter Verwendung der Analysenprogramme Fetchan und pStat der pclamp 6.03-Software (Axon Instruments, Inc, USA) ausgewertet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Fluoreszierendes Insulin-EGFP-Fusionsprotein als Marker für Insulin-Sekretgranula

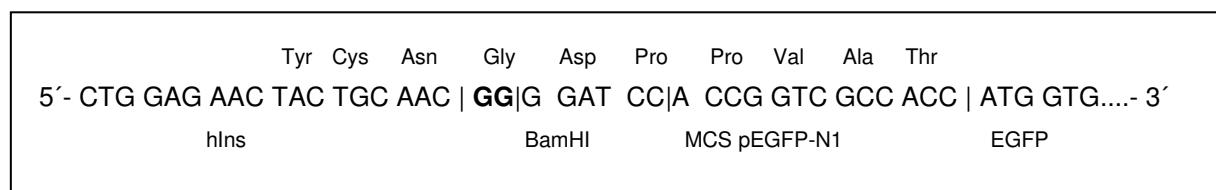
Der konzeptionell einfachste Ansatz zur selektiven Darstellung von Insulin-Sekretgranula ist die Markierung des Insulins mittels eines fluoreszierenden Proteins. Die Gruppe um Nagamatsu hatte berichtet, mit einem an das Insulin C-terminal fusionierten EGFP eine Markierung erreicht zu haben, die für funktionelle Untersuchung mittels TIRF-Mikroskopie geeignet sein sollte. Allerdings waren weder DNA noch Informationen über die Sequenz von der Gruppe zu erhalten. Insofern sollte ein eigenes Konstrukt unter Verwendung des pEGFP-N1 Vektors (Clontech) und des humanen Insulin-Gens generiert werden.



**Abb. 4.1 Vektorkarte von pEGFP-N1 nach Einfügen des humanen Präproinsulin-Gens (oben).** Das EGFP befindet sich am C-terminalen Ende der A-Kette des Insulins, und ist mit diesem über eine Kette von 7 Aminosäuren verbunden (unten). Es ist zu beachten, dass die Darstellung schematisch ist, und EGFP mit 238 Aminosäuren deutlich größer als Insulin mit 51 Aminosäuren ist.

#### 4.1.1. Die Linker-Sequenz zwischen dem Insulin und dem EGFP-Anteil des Fusionsproteins

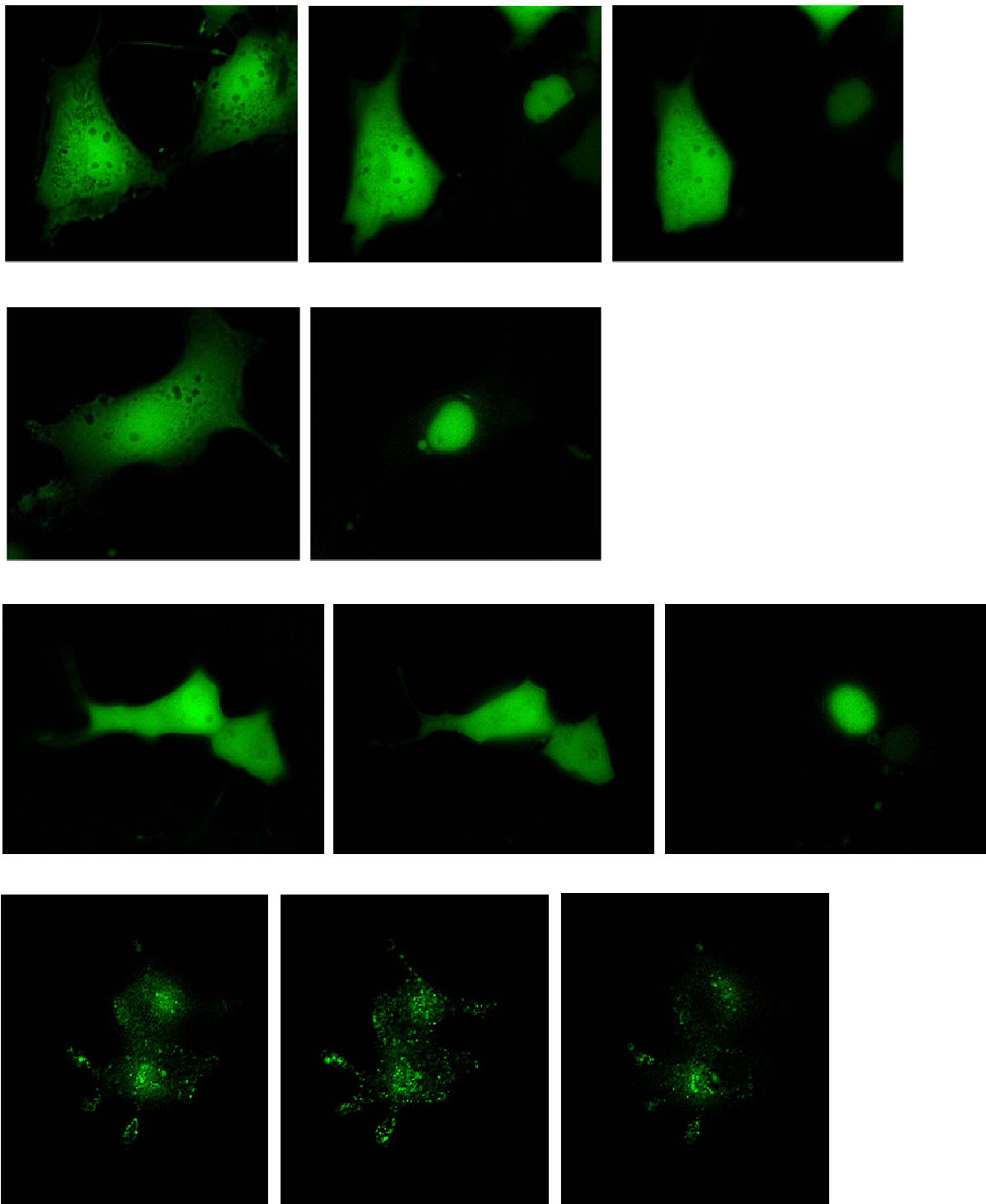
Ziel war es, eine rekombinante DNA zu generieren, die für ein Fusionsprotein aus humanem Insulin und dem fluoreszierenden Protein EGFP codiert. Dieses Fusionsprotein sollte so konstruiert sein, dass das fluoreszierende Protein später am C-terminalen Ende der A-Kette des Insulins exprimiert wird. Dafür war es notwendig, dass die Translation der beiden fusionierten DNA-Abschnitte am N-Terminus der B-Kette des Insulins begann und bis zum C-Terminus des EGFP nicht unterbrochen wurde. Die Versuche, eine solche Fusions-DNA zu generieren, waren zunächst nicht erfolgreich, da beim Design der Oligonucleotid-Primer nicht beachtet wurde, dass am Ende der Insulin-DNA-Sequenz noch ein Stopp-Codon enthalten war, was zur Folge hatte, dass das EGFP nicht translatiert wurde. Ein zweiter Versuch scheiterte daran, dass beim Primer-Design nicht darauf geachtet wurde, das Leseraster intakt zu halten. Zwei fehlende Basenpaare hatten zur Folge, dass das Startcodon des EGFP nicht als solches translatiert wurde. Nach Einfügen dieser beiden fehlenden Basenpaare war das Leseraster intakt, und die Fusionsprotein-DNA wurde in ihrer gesamten Länge translatiert und das Protein exprimiert. Die erforderlichen zwei Basen wurden so gewählt, dass die resultierende Aminosäure möglichst klein war und keine funktionellen Gruppen trug, die möglicherweise zu sterischen Wechselwirkungen führen könnten. Somit ergab sich zwischen dem C-terminalen Ende vom Insulin und dem N-Terminus vom EGFP ein Linker-Bereich von 7 Aminosäuren mit der Sequenz Gly-Asp-Pro-Pro-Val-Ala-Thr, wobei sich das Glycin aus den zusätzlich eingefügten Basen, und die anderen Aminosäuren aus der Basen-Sequenz der multiple cloning site des Vektors pEGFP-N1 ergaben (Abb. 4.1 und Abb. 4.2). Mit diesem Konstrukt konnte eine den Erfordernissen entsprechende Markierung der Granula erzielt werden, wie auch folgend erläutert.



**Abb. 4.2 Linker-Region des Insulin-EGFP-Fusionsproteins.** Das humane Präproinsulingen wurde in die multiple cloning site des pEGFP-N1 Vektors eingeführt, in dem zuvor mittels PCR die BamHI-Schnittstelle um zwei Guanin-Basen verlängert worden war, um das Leseraster zu erhalten. Daran schlossen sich an das C-terminale Asparagin des humanen Insulins die Aminosäuren -Gly-Asp-Pro-Pro-Val-Ala-Thr- an, bevor die Sequenz des EGFP begann.

#### **4.1.2. Nachweis der subzellulären Lokalisation des Insulin-EGFP-Fusionsproteins**

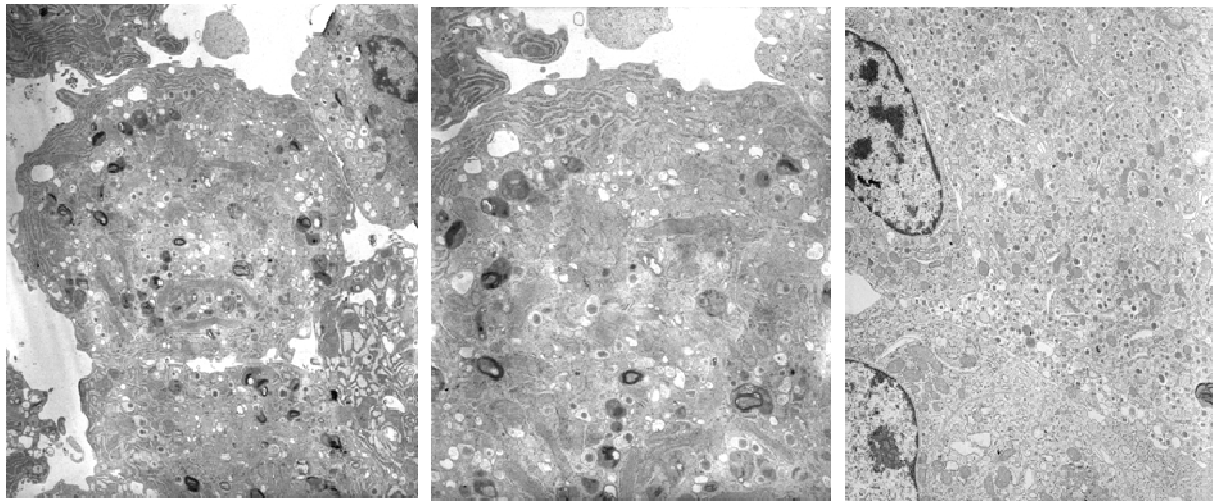
Das zentrale Kriterium für die Verwendbarkeit des Konstrukts ist die subzelluläre Lokalisation. Durch Vergleich der Expression von Insulin-EGFP mit der von EGFP in insulinproduzierenden INS1-E-Zellen konnte ein deutlicher Unterschied im Fluoreszenzmuster festgestellt werden. Die EGFP-Expression ergab eine homogene Verteilung der Fluoreszenz, wie es einer zu erwartenden cytosolischen Verteilung entspricht. Insulin-EGFP Expression ergab ein granuläres Muster, wie es der Lokalisation in Sekretgranula entspricht. Die Spezifität des Verteilungsmusters wurde durch Expression von Insulin-EGFP in COS1-Zellen belegt. In dieser nicht sekretorischen Zelllinie war kein granuläres Muster zu beobachten. Die Permeabilisierung der Plasmamembran mit Digitonin brachte einen weiteren Beweis dafür, dass das in insulinproduzierenden Zellen beobachtete Fluoreszenzmuster tatsächlich granulären Ursprungs ist. Digitonin permeabilisiert zunächst Membranen, die Cholesterin enthalten und ist deshalb relativ selektiv für die Plasmamembran und intrazelluläre Membranen bleiben intakt. Dementsprechend war in INS1-E-Zellen zu beobachten, dass die homogene cytosolische Fluoreszenz von EGFP schnell (innerhalb von ca. 1,5 Minuten), die granuläre Fluoreszenz von Insulin-EGFP nur sehr langsam (unvollständige Reduktion innerhalb von 60 Minuten) ausgewaschen wurde. Insulin-EGFP ist in INS1-E-Zellen also in einem Membran umschlossenen Kompartiment exprimiert, was mit großer Wahrscheinlichkeit den Sekretgranula entspricht (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3 Vergleich der Transfektion mit Insulin-EGFP mit derjenigen mit EGFP (Kontrolle).** Bei der Transfektion mit EGFP ergibt sich eine gleichmäßige Grünfluoreszenz der gesamten Zelle, bei der Transfektion mit Insulin-EGFP wird dagegen ein granuläres Muster sichtbar, jedoch nur in den insulinproduzierenden INS1-E-Zellen, nicht jedoch in der Nierenzelllinie COS1-Zellen (Zeilen 1 und 2), die weder Insulin exprimieren noch Sekretgranula haben. Durch Permeabilisierung der Plasmamembran mit Digitonin wurde der Unterschied noch deutlicher sichtbar, als sich die cytosolische Fluoreszenz innerhalb kurzer Zeit (1,5 Minuten) praktisch vollständig auswaschen ließ (Zeile 3), während das granuläre Muster über 60 Minuten erhalten blieb (Zeile 4).

#### 4.1.3. Ultrastruktur der Sekretgranula von stabil transfizierten MIN6-Zellen

Mit dem Nachweis der granulären Lokalisation des Insulin-EGFP Konstrukts entstand die Frage, ob die Expression, da sie durch einen starken unregulierten Promotor getrieben wird (CMV), die Struktur der Granula beeinflusst. In MIN6-Zellen, dem später für Transfektionen bevorzugtem Zelltyp, zeigte sich jedoch, dass der ultrastrukturelle Aspekt unverändert war, und sich weiterhin der typische elektronendichte Kern mit umgebender elektronenschwachen Halo-Region in den Insulingranula zeigten (Abb. 4.4).

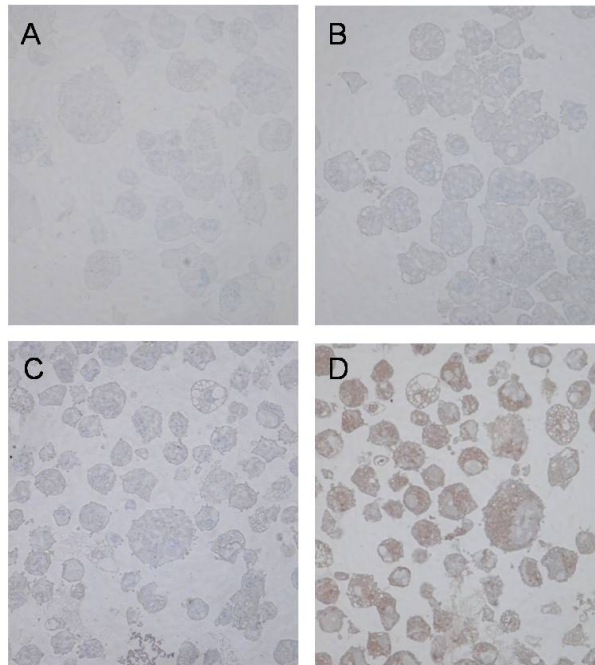


**Abb. 4.4 Ultrastruktur von stabil transfizierten Insulin-EGFP MIN6-Zellen.** Die Sekretgranula von stabil transfizierten MIN6-Zellen (links und mitte, 4000 und 8000x) wiesen den gleichen typischen Aspekt auf wie diejenigen von nicht transfizierten MIN6-Zellen (rechts, 4000x).

#### 4.1.4. Nachweis der regulären Insulin-Prozessierung in transfizierten MIN6-Zellen durch Antikörper-Färbung des C-Peptids

Weiterhin interessierte bei der Charakterisierung der Transfektion wieweit die Insulin-Prozessierung in den Granula regulär abläuft. Durch Verwendung von anti-EGFP- und anti-C-Peptid-Antikörpern konnten folgende Aussagen ermöglicht werden: 1) In Kontroll-MIN6-Zellen ist nur wenig C-Peptid und eine praktisch fehlende EGFP-Anfärbung erkennbar, 2) In transfizierten Zellen hingegen ist die Anfärbung durch anti-C-Peptid parallel mit derjenigen durch anti-EGFP verstärkt. Die durch

Transfektion bewirkte Insulingenexpression überwiegt also bei weitem die endogene. Das Insulin wird anscheinend regulär prozessiert, so dass C-Peptid nachweisbar wird (Abb. 4.5).



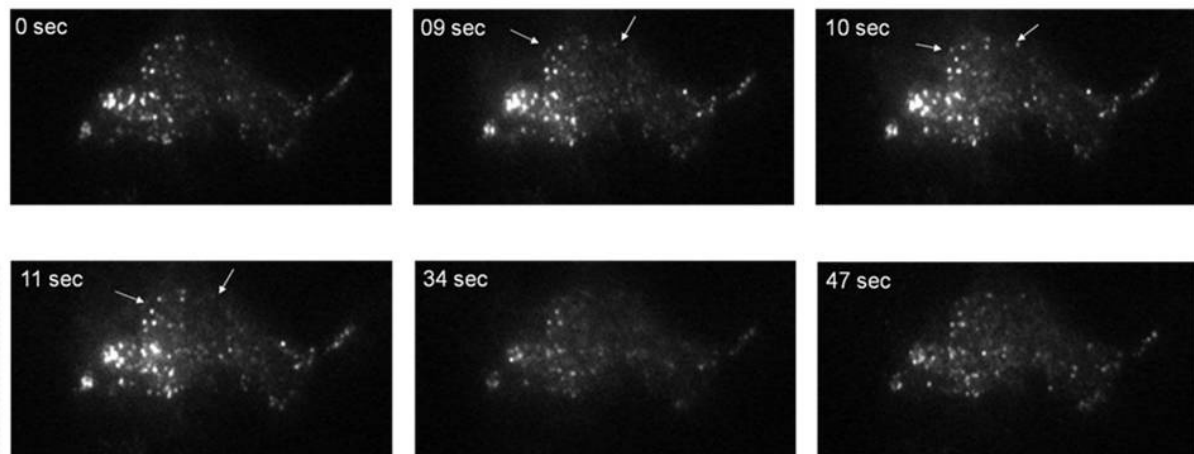
**Abb. 4.5 Immunohistochemie von Insulin-EGFP exprimierenden MIN6-Zellen.** In Kontrollzellen war nur eine geringe Anfärbung mit Antikörpern gegen EGFP (A) und C-Peptid (B) zu erzielen, während in den transfizierten Zellen sowohl EGFP (C) als auch C-Peptid (D) deutlich vermehrt nachweisbar waren.

#### 4.1.5. Nachweis der Exozytose von Insulin-EGFP durch transfizierte insulinproduzierende Zellen

Das Labelling der Sekretgranula sollte primär zur Quantifizierung der Zahl der Granula und ihrer Beweglichkeit dienen. Darüber hinaus war jedoch auch die Beobachtung der exozytotischen Aktivität von Interesse. Der Nachweis einer Reaktion auf einen exozytotischen Stimulus kann zudem als wichtigster Aspekt angesehen werden, dass die granuläre Fluoreszenz tatsächlich den Insulin-Sekretgranula entspricht. Dieser Nachweis wurde mit der TIRF-Mikroskopie (s. Kapitel 3.10.2) erbracht. Wurden insulinproduzierende RINm5F-Zellen mit dem Expressionsvektor pEGFP-N1/hIns-EGFP transient transfiziert, mit Krebs-Ringer-Medium umströmt, und ab Sekunde 8 nach Beginn der Registrierung die  $K^+$ -Konzentration von 5,6 auf 40 mM erhöht, nahm die Fluoreszenz einiger Granula innerhalb von 1 - 2 Sekunden zu und weitere fluoreszierende Granula verschwanden. Danach nahm im Durchschnitt die Fluoreszenzintensität ab bis zum Zeitpunkt  $t = 34$  Sekunden ein Minimalwert erreicht war. Danach gab es trotz fortgesetzter Stimulation eine Zunahme der Intensität, allerdings nicht der Granulazahl.



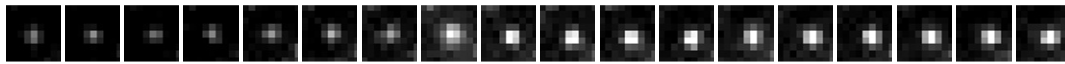
Anhand der ausgewählten Einzelbilder nicht erkennbar, im zugrundeliegenden aufgenommenen Zeitrafferfilm jedoch sichtbar ist, dass sich ein fluoreszierender Schleier zum Zeitpunkt der Stimulation über die Zelle legt. Naheliegender ist es, hier das freigesetzte fluoreszierende Insulin zu vermuten. In jedem Falle ist mit diesem Ergebnis die Reaktivität des Fluoreszenzmusters auf einen typischen Exozytosestimulus belegt, und die Sekretgranula von insulinsezernierenden Zellen können als Ursprungsort der granulären Fluoreszenz von Insulin-EGFP angenommen werden (Abb. 4.6).



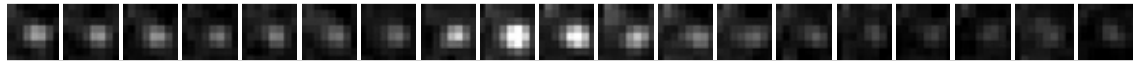
**Abb. 4.6 Darstellung der KCl-induzierten Insulinsekretion von RINm5F-Zellen durch TIRF Mikroskopie der Insulin-EGFP-haltigen Sekretgranula.** Die KCl-Depolarisation (ab Zeitpunkt 9 sec) führt zu einer deutlichen Intensivierung der Fluoreszenz der plasmamembrannahen Sekretgranula. Nach dem Tiefpunkt zum Zeitpunkt 34 sec zeigt sich eine langsame Intensivierung der granulären Fluoreszenz.

Die Verwendbarkeit des Insulin-EGFP Konstrukts für die Quantifizierung der Exozytose wurde durch Beobachtung einzelner Granula während der Kalium-Depolarisation und Aufstellen eines Reaktionsmusters geprüft (Abb. 4.7). Es ergab sich, dass ein heterogenes Reaktionsmuster vorlag, in dem im Wesentlichen drei Typen unterschieden werden konnten: 1) dauerhafte Intensivierung der Fluoreszenz, 2) vorübergehende Intensivierung, 3) Abnahme und praktisches Erlöschen der Fluoreszenz. Somit eignet sich das Konstrukt zur Markierung von Insulin-Sekretgranula und Verfolgen der Wanderstrecke, jedoch nur bedingt zum Erfassen der Exozytose.

dauerhafte Intensivierung



vorübergehende Intensivierung



starke Verminderung

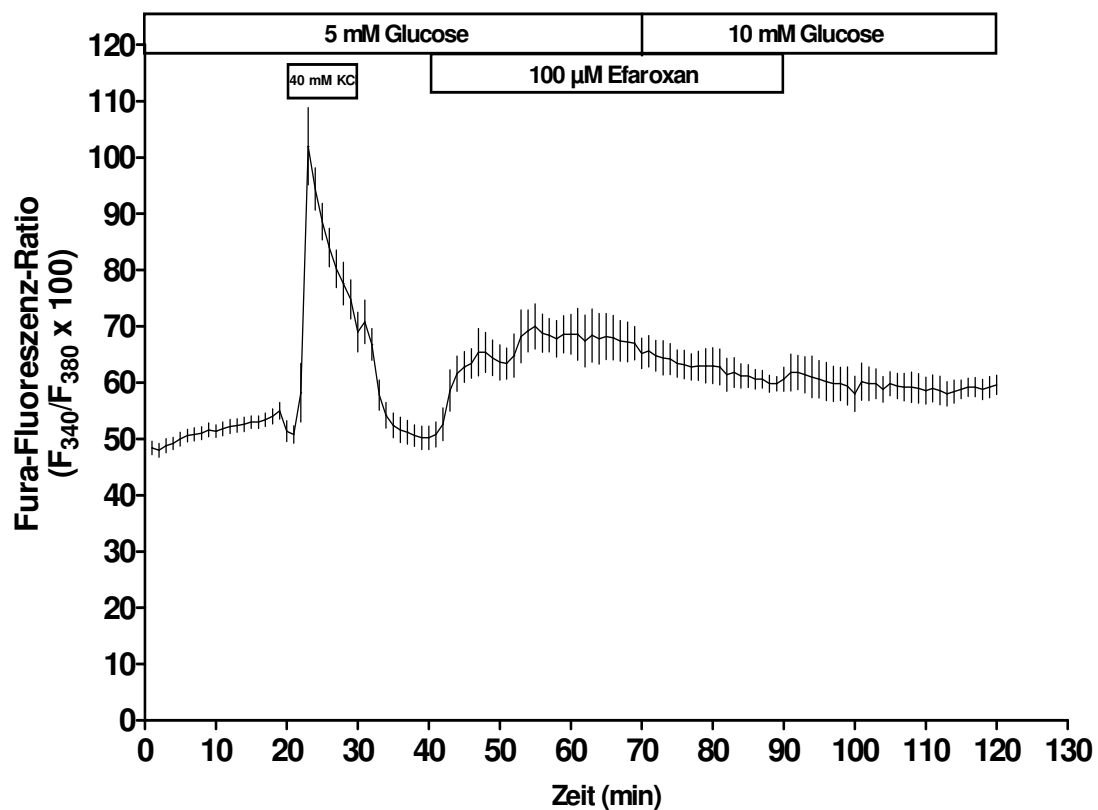


1  $\mu\text{m}$

**Abb. 4.7 Unterschiedliche Reaktionsmuster von einzelnen Insulin-EGFP-haltigen Sekretgranula im Verlauf der KCl-Depolarisation von RINm5F-Zellen.** Neben einer dauerhaften Intensivierung (obere Reihe) der Fluoreszenz eines einzelnen Granulums ist eine vorübergehende Intensivierung (mittlere Reihe) und eine starke Verminderung (untere Reihe) zu verzeichnen.

#### 4.1.6. Nachweis der depolarisationsinduzierten Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration in stabil transfizierten MIN6-Zellen

Wegen der leichten Transfizierbarkeit und Unkompliziertheit in der Zellkultur wurde die insulinproduzierende Ziellinie MIN6 ausgewählt. Von denen durch stabile Transfektion erhaltenen Klonen wurde einer auf die funktionelle Kompetenz geprüft. Hierfür wurde die freie cytosolische Calciumkonzentration nach Beladung mit Fura-2 während der Stimulation mit 40 mM KCl und 100  $\mu\text{M}$  Efaroxan, einem  $K_{\text{ATP}}$ -Kanal blockierenden Imidazolin, gemessen. Die Zellen des stabil transfizierten Klons zeigten einen starken und schnellen Anstieg der Fura-Fluoreszenz-Ratio als Antwort auf die Kalium-Depolarisation. 100  $\mu\text{M}$  Efaroxan führten ebenfalls zu einem Anstieg, dessen Höhe ungefähr derjenigen des steady state der Kalium-Depolarisation entspricht. Die Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 auf 10 mM war nicht von akuten Änderungen der Fura-Fluoreszenz-Ratio begleitet, ebenso wenig das Auswaschen von Efaroxan (Abb. 4.8). Obgleich hierdurch Unterschiede zu den Verhältnissen an Pankreasinseln deutlich werden, so ist die prinzipielle Verwendbarkeit der stabil transfizierten Zelllinie für eine TIRF-Messung von depolarisierenden Stimuli belegt.

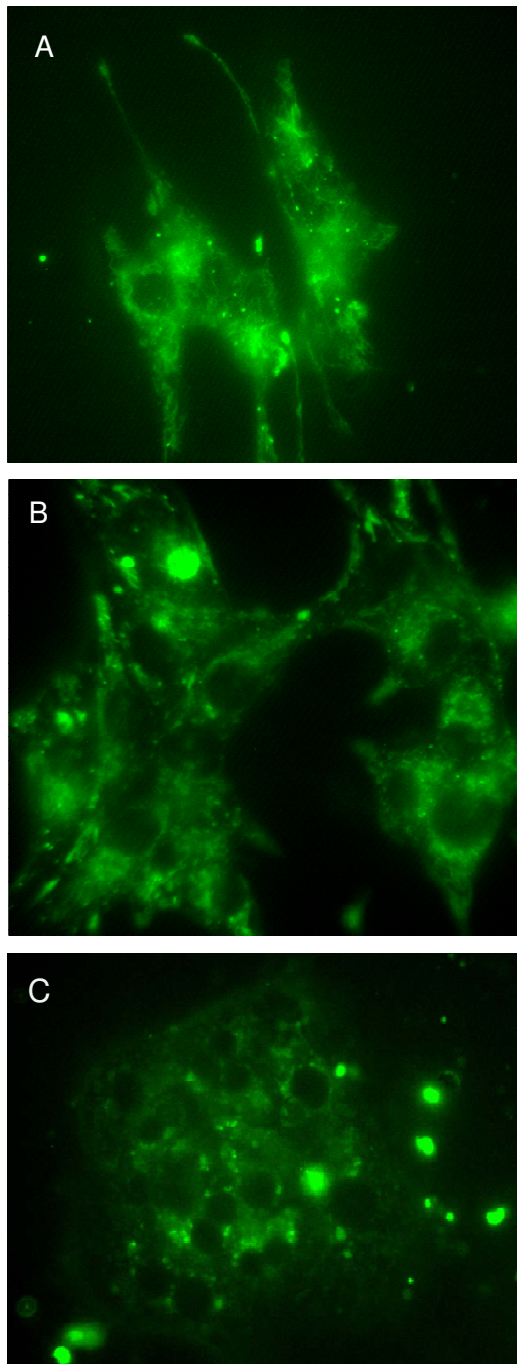


**Abb. 4.8** Reaktion der freien cytosolischen Calcium-Konzentration von stabil Insulin-EGFP transfizierten MIN6-Zellen auf Stimulation mit 40 mM KCl und 100 µM Efaroxan in Gegenwart von 5 und 10 mM Glucose. Die transfizierten Zellen zeigen die typische schnelle Reaktion auf Kalium-Depolarisation und einen Anstieg auf Efaroxan, der annähernd dem Plateauwert der Kalium-Depolarisation entspricht, allerdings keine Erhöhung beim Wechsel von 5 auf 10 mM Glucose. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 5 Zellen.

## 4.2. Expression von Insulin-EGFP in MIN6-Zellen und $\beta$ -Zellen nach lentiviraler Infektion

Da insulinproduzierende Zelllinien nur ein unvollkommener Ersatz für primäre  $\beta$ -Zellen sind, legt die Anwendungsperspektive für fluoreszierende Insulin-Fusionsproteine die virale Transfektion primärer  $\beta$ -Zellen nahe.

Mit einem lentiviralen Vektor ließen sich sowohl MIN6-Zellen als auch primäre  $\beta$ -Zellen von NMRI Mäusen transfizieren (Abb. 4.9).

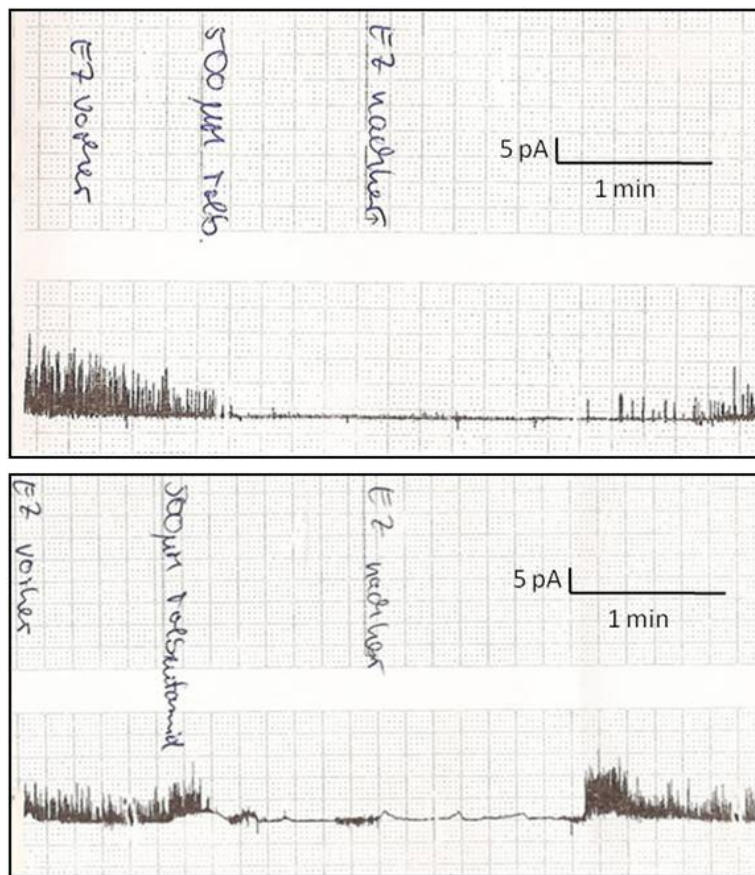


**Abb. 4.9 Lentivirale Infektion von MIN6-Zellen (A und B) und einem Cluster von primären  $\beta$ -Zellen (C) mit Insulin-EGFP.**

Beide Aufnahmen wurden ca. 24 Stunden nach Infektion angefertigt. Die granuläre Fluoreszenz ist hier von einer weitgehend homogenen Fluoreszenz überlagert. Es kann sich bei letzterer um die Autofluoreszenz der Zellen handeln. Zusätzlich sind die Messbedingungen durch Reflektion des Anregungslichts in der seinerzeit verwendeten Messkammer (klares Plexiglas!) ungünstig beeinflusst, der in diesen Messungen verwendete FITC-Filter hatte ein wesentlich größeren Transmissionsbereich für die Fluoreszenzemission als der später verwendete HC-BP 520/35-Filter. In jedem Falle sind die großen fluoreszierenden Aggregationen nur im Gefolge der lentiviralen Infektion, nicht aber bei transienter Transfektion zu beobachten gewesen.

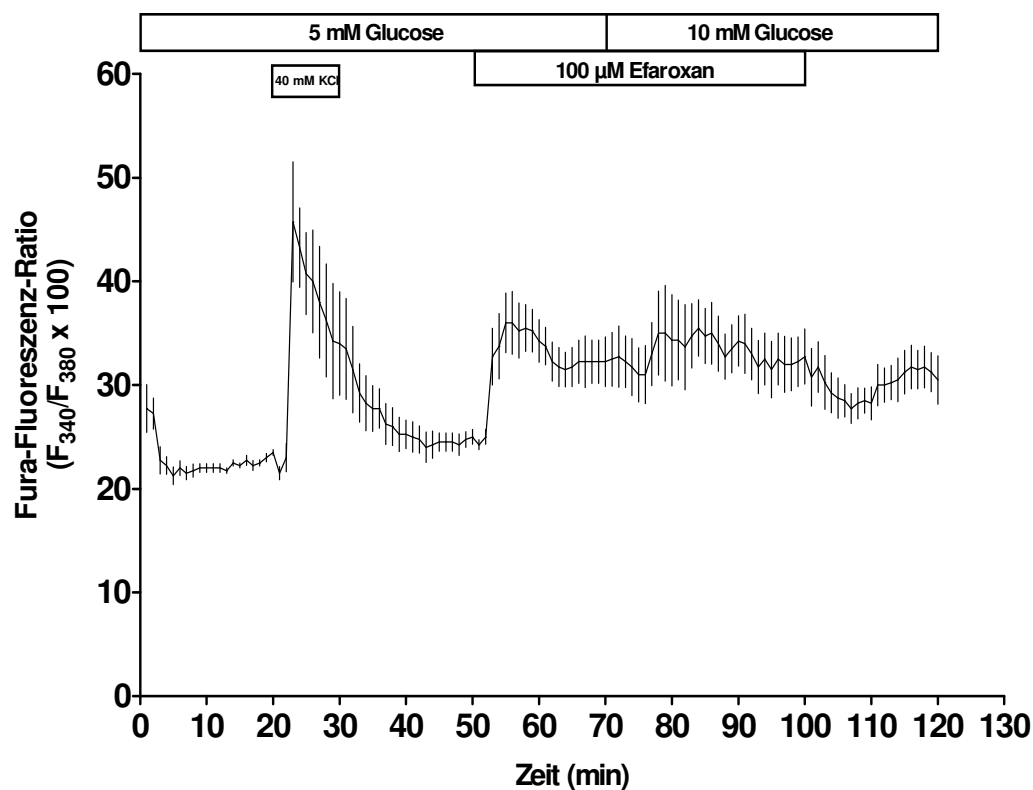
Auffallend war in beiden Fällen, dass neben der granulären Fluoreszenz auch eine grobschollige Fluoreszenz zu beobachten war, sowie eine Überlagerung mit einem Schleier von homogener Grünfluoreszenz, bei der es sich um die zelluläre Autofluoreszenz handeln könnte. Mit dem Messplatz, der für die Dokumentation dieser Fluoreszenz genutzt werden konnte, waren allerdings nur suboptimale Messbedingungen möglich. Die grobschollige Fluoreszenz ist jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit durch das Expressionssystem bedingt. Insofern kann dieser Nachweis von viral übertragenem Insulin-EGFP nur als Beleg der prinzipiellen Machbarkeit dienen.

Gleichzeitig wurde getestet, ob solche viral infizierten Zellen noch funktionell kompetent waren. Mittels der Patch-Clamp-Technik ließ sich bei Abwesenheit von Glucose eine Ionenkanalaktivität nachweisen, die durch 500  $\mu\text{M}$  Tolbutamid vollständig aber reversibel hemmbar war, also einer  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanalaktivität entsprach (Abb. 4.10). Es bleibt herauszufinden, ob durch Veränderung des Infektionstiters das grobschollige Muster zum Verschwinden gebracht werden kann, und ausschließlich granuläre Lokalisation erreicht werden kann.



**Abb. 4.10 Funktionskontrolle der MIN6-Zellen nach lentiviraler Infektion mit Insulin-EGFP.** Wie in primären  $\beta$ -Zellen lässt sich in MIN6-Zellen eine  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal-Aktivität messen, die durch 500  $\mu\text{M}$  Tolbutamid vollständig hemmbar ist (oben). In den mit Insulin-EGFP-infizierten MIN6-Zellen war ebenfalls eine spontane  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal-Aktivität festzustellen, die wie in den Kontrollzellen durch 500  $\mu\text{M}$  vollständig hemmbar war (unten).

Auch für Fura-2 beladene primäre  $\beta$ -Zellen ließ sich die erhaltene funktionelle Kompetenz nach viraler Infektion belegen (Abb. 4.11). Nicht nur die Reaktion auf 40 mM KCl und die Reaktion auf 100  $\mu$ M Efaroxan entsprach den Verhältnissen bei normalen  $\beta$ -Zellen, auch die Reaktion auf eine Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 auf 10 mM -vorübergehende Abnahme und danach Erhöhung der Fura-Fluoreszenz-Ratio- war typisch. Die virale Infektion mit Insulin-EGFP scheint also die Stimulus-Sekretions-Kopplung bis zur Regulation der cytosolischen Calciumkonzentration nicht zu beeinträchtigen.

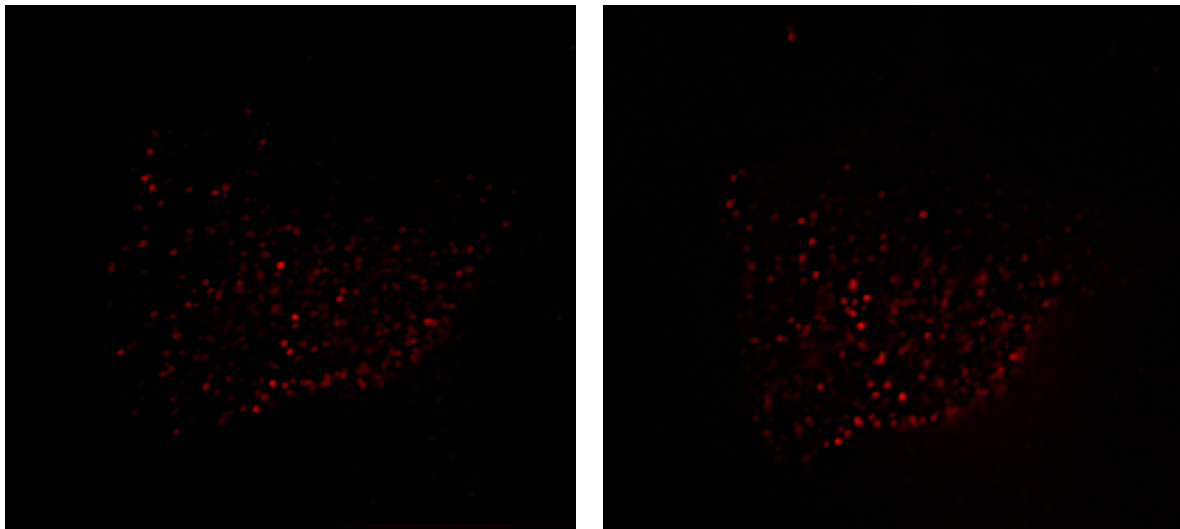


**Abb. 4.11 Funktionskontrolle von primären  $\beta$ -Zellen nach lentiviraler Infektion mit Insulin EGFP.** Wie in nicht infizierten  $\beta$ -Zellen lässt sich durch Efaroxan in Gegenwart von 5 mM Glucose eine deutliche Steigerung der Fura-Fluoreszenz-Ratio bewirken. Die Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM führte zu einer weiteren Erhöhung der Fura-Fluoreszenz-Ratio, die durch Auswaschen von Efaroxan partiell rückläufig war. Auch dieser Befund entspricht den Verhältnissen in normalen Mauseinseln bzw.  $\beta$ -Zellen (WIENBERGEN 2006).

### 4.3. Fluoreszierendes Insulin-tdimer2(12) Fusionsprotein als Marker für Insulin-Sekretgranula

#### 4.3.1. Nachweis der subzellulären Lokalisation des Insulin-tdimer-Fusionsproteins durch Permeabilisierung der Plasmamembran transient transfizierter MIN6-Zellen

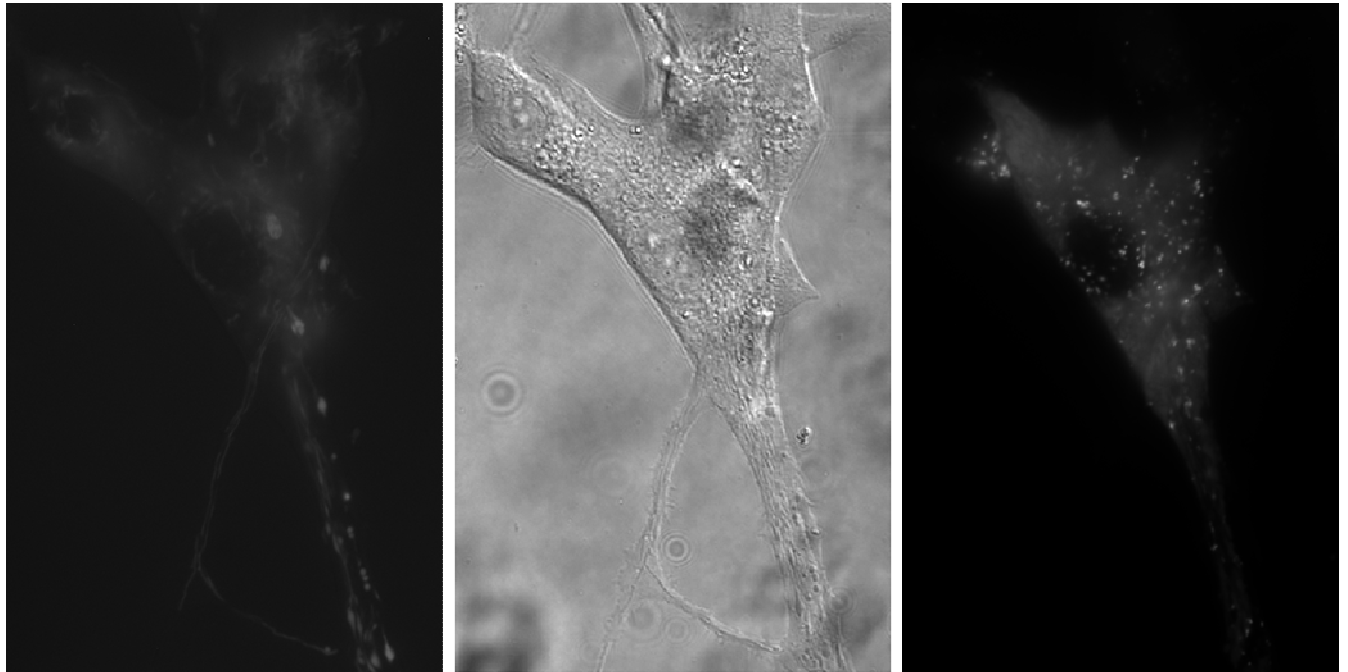
Zum Nachweis der subzellulären Lokalisation von bestimmten Proteinen (z.B. des Sulfonylharnstoffrezeptors) in insulinsezernierenden Zellen erschien das Verfahren der Co-Lokalisation mit einem gut charakterisierten Fluoreszenzlabel als vielversprechend. Daher wurde ausgehend vom Insulin-EGFP ein Insulin-tdimer-Fusionsprotein generiert, um die gleichzeitige Detektion von EGFP-markierten Proteinen zu ermöglichen. Wie mit dem Insulin-EGFP Label (s. Kapitel 4.1.2) wurde die granuläre Lokalisation von Insulin-tdimer durch Digitonin-Permeabilisierung von transient transfizierten Zellen geprüft. Auch mit diesem Konstrukt blieb das granuläre Fluoreszenzmuster 60 Minuten nach der Permeabilisierung erhalten (Abb. 4.12).



**Abb. 4.12 Permeabilisierung der Plasmamembran von transient transfizierten MIN6-Zellen.** MIN6-Zellen, die das Insulin-tdimer-Fusionsprotein transient exprimierten zeigten ein granuläres Fluoreszenzmuster, das mit dem des Insulin-EGFP vergleichbar war. Nach Permeabilisierung der Plasmamembran mit Digitonin und anschließender 60 minütiger Umströmung der Zellen mit Krebs-Ringer-Medium blieb dieses weitestgehend erhalten. Das linke Bild zeigt die Zelle vor der Permeabilisierung, das rechte Bild nach 60 minütiger Umströmung.



#### 4.3.2. Abtrennung der tdimers-Fluoreszenz von der Autofluoreszenz von MIN6-Zellen



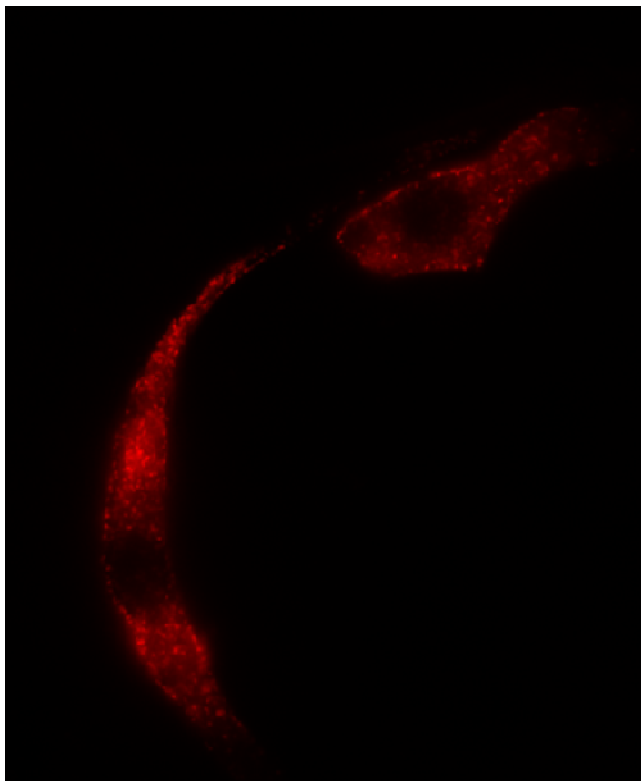
**Abb. 4.13 Autofluoreszenz von MIN6-Zellen.** MIN6-Zellen, die bei 470 nm angeregt wurden (links), zeigten eine deutliche Autofluoreszenz. Das Durchlichtbild (DIC-Kontrast) ist in der Mitte dargestellt, rechts ist die Fluoreszenz der Sekretgranula dargestellt, die das Insulin-tdimer-Fusionsprotein enthalten. Diese Fluoreszenz wurde bei 546 nm angeregt. Im Fall des Insulin-tdimers ist die Abtrennung der Autofluoreszenz allein durch die unterschiedliche Anregungswellenlänge möglich, nicht jedoch im Falle des Insulin-EGFP.

Im Zuge der Untersuchung zu den Mechanismen der Desensibilisierung der Insulinsekretion (s. Kapitel 4.7) wurde auch die Fluoreszenz von nicht transfizierten Zellen gemessen. Es ergab sich überraschenderweise, dass die Autofluoreszenz nicht homogen cytosolisch war, sondern ein granuläres Muster aufwies (Abb. 4.13). Wenngleich die Intensität deutlich geringer war als bei den Insulin-EGFP transfizierten Zellen, war doch eine Verfälschung der Ergebnisse ohne Korrektur nicht auszuschließen. Es wurde daher versucht a) die Ursache der Autofluoreszenz aufzufinden und b) Messbedingungen zu definieren, bei denen der Beitrag der Autofluoreszenz zum Gesamtsignal vernachlässigbar gering war. Die Messbedingungen waren insofern dem Problem anzupassen, als in Metamorph, dem Analyseprogramm, ein Schwellenwert der Fluoreszenzintensität definiert werden konnte, der die grobscholligen schwach fluoreszierenden Granula von der Erfassung ausschloss. Je nach eingestellter Belichtungszeit, die sich aus der unterschiedlichen

Expressionsstärke der Fusionsproteine ergab, variierte jedoch die Fluoreszenzintensität der einzelnen Aufnahmen geringfügig, so dass es nicht möglich war, einen konstanten Schwellenwert einzustellen, um die Aufnahmen automatisiert auszuwerten. Es war im Gegenteil erforderlich, den Schwellenwert, der die grobscholligen unspezifischen Floreszenzen von der Erfassung ausschloss, für jede Aufnahme manuell zu definieren, um nur die Zahl der eigentlichen Sekretgranula zu bestimmen. Demnach waren die Ergebnisse grundsätzlich von der Person beeinflussbar, die für die Auswertung verantwortlich war. Eine hohe Anzahl unabhängiger Versuche sollte diese Ungenauigkeit vermindern.

#### **4.3.3. Unterschied in der Fluoreszenzmarkierung von transient und von stabil transfizierten MIN6-Zellen**

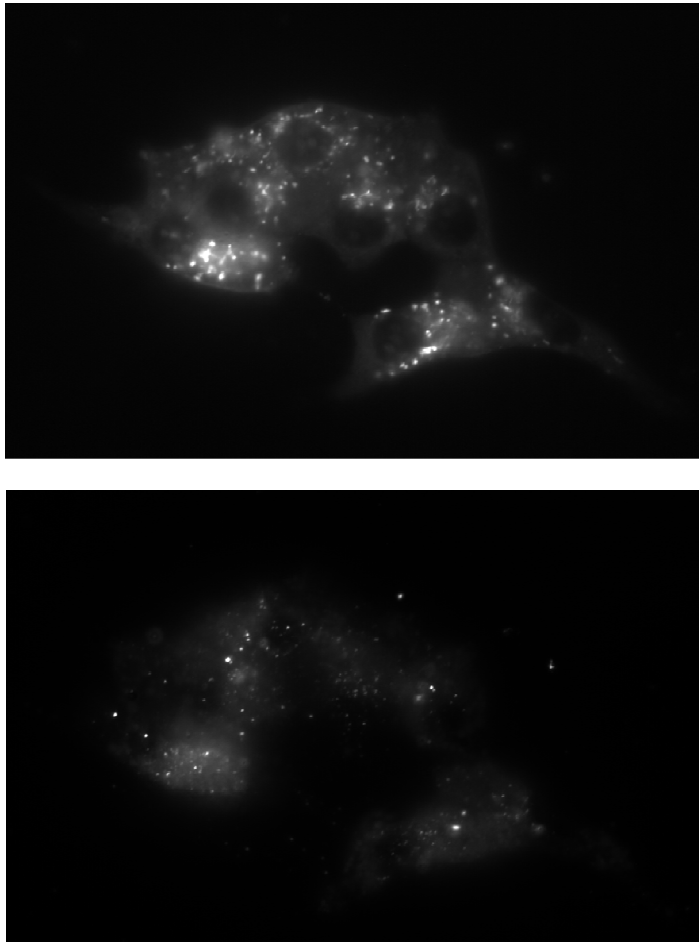
Innerhalb der ersten 36 Stunden der Expression in MIN6-Zellen nach transients Transfektion mit Insulin-tdimer kam es zum Auftreten von feingranulären Strukturen, bei längerer Expressionsdauer traten jedoch zusätzlich gröbere Granula auf. Wie in Abb. 4.14 dargestellt, handelt es sich hier um die extragranuläre Akkumulation von fluoreszierendem Material.



**Abb. 4.14 Unterschiedliche granuläre Strukturen in MIN6-Zellen nach transienter Transfektion für 48 Stunden mit Insulin-tdimer.**

Innerhalb der ersten 36 Stunden der Expression kam es zum Auftreten von feingranulären Strukturen (Zelle oben rechts), bei längerer Expressionsdauer traten in einer zunehmenden Zahl von Zellen zusätzlich gröbere intensiver fluoreszierende Granulierung auf (Zelle unten links).

Das gleiche Problem tauchte in MIN6-Zellen auf, die mit Insulin-tdimer stabil transfiziert waren. Bei Verwendung stabil transfizierter Zellen fiel auf, dass sie im Vergleich mit transient transfizierten Zellen, die das gleiche Konstrukt exprimierten, Granula mit atypisch großem Durchmesser und besonders intensiver Fluoreszenz enthielten (Abb. 4.15).



**Abb. 4.15 Akkumulation von fluoreszierendem Material in MIN6-Zellen, die mit Insulin-tdimer stabil transfiziert sind.**

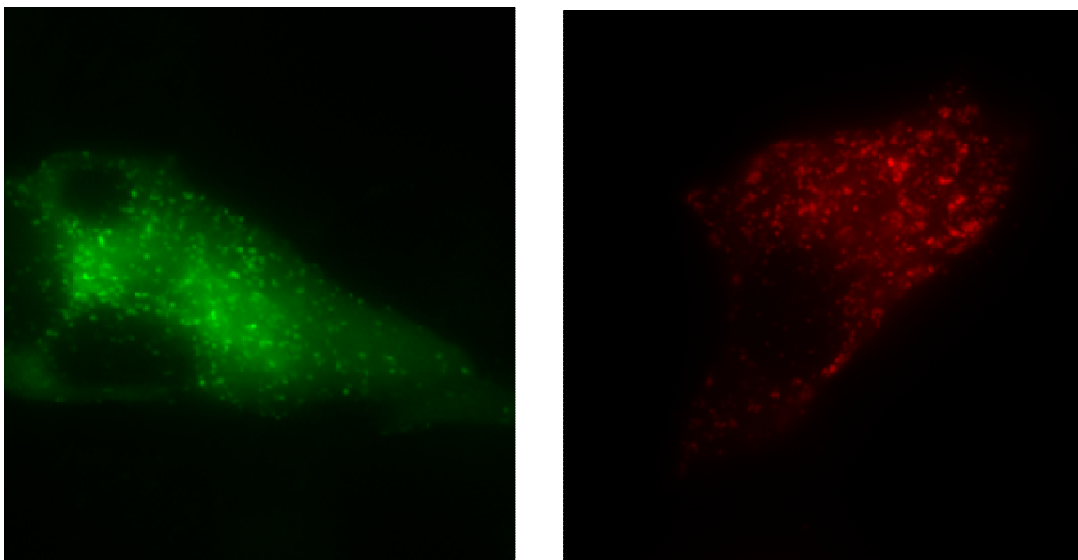
Bei Verwendung stabil transfizierter Zellen fiel auf, dass sie im Vergleich zu transient transfizierten Zellen, die das gleiche Konstrukt exprimierten, Granula mit atypisch großem Durchmesser und besonders intensiver Fluoreszenz enthielten (oben). Durch Permeabilisierung der Plasmamembran mit Digitonin wurden diese granulären Strukturen innerhalb einer Stunde praktisch vollständig ausgewaschen, während die weniger intensiv fluoreszierenden kleineren Granula erhalten blieben (unten).

Durch Permeabilisierung der Plasmamembran mit Digitonin wurden diese granulären Strukturen innerhalb einer knappen Stunde praktisch vollständig ausgewaschen, während die weniger intensiv fluoreszierenden kleineren Granula erhalten blieben. Aufgrund der Auswaschbarkeit des fluoreszierenden Materials liegt die Vermutung nahe, dass es sich hier um die fluoreszierenden Insulin-Fusionsproteine handelt, die extragranulär aggregiert sind. Dies trifft gleichermaßen auf die Strukturen in stabil transfizierten Zellen zu wie auf diejenigen, die nach längerer Dauer der Expression zu beobachten sind.

Für die Verwendung der stabil transfizierten Zellen in Versuchen, in denen die Degranulierung und Regranulierung nach Desensibilisierung gemessen werden sollte (s. Kapitel 4.7), ergab sich hierdurch die Notwendigkeit, vor dem Zählen der Sekretgranula die Membran zu permeabilisieren um die Sekretgranula von den pseudogranulären Strukturen zu unterscheiden.

#### **4.3.4. Vergleich der subzellulären Lokalisation der Sekretgranula von Insulin-EGFP mit der von Insulin-tdimer**

Als vergleichende Bewertung des Insulin-EGFP Konstrukts und des Insulin-tdimer Konstrukts lässt sich festhalten, dass die grundlegenden Eigenschaften für die Markierung der Sekretgranula gleich sind. Eine selektive Markierung ist innerhalb der ersten 48 Stunden nach transients Transfektion erreicht (Abb. 4.16), das granuläre Fluoreszenzmuster bleibt auch nach einstündiger Permeabilisierung praktisch unverändert. Es kann also angenommen werden, dass unter diesen Bedingungen die Fluoreszenz praktisch ausschließlich membranumschlossenen Kompartimenten entstammt (vgl. Kapitel 4.1.2 und 4.3.1).



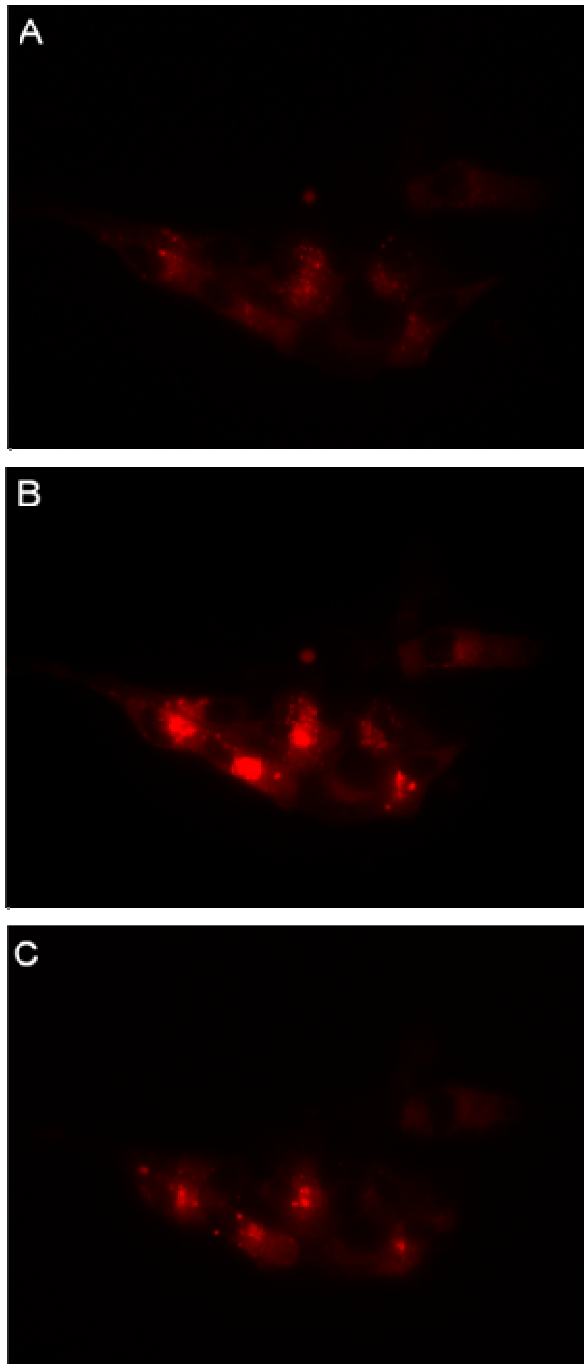
**Abb. 4.16 Vergleich der Granulastruktur von Insulin-EGFP - und Insulin-tdimer-transfizierten MIN6-Zellen.**

In einem Zeitraum von bis zu 48 Stunden nach transients Transfektion ergab sich mit beiden Labeln eine gleichmäßige feingranuläre Fluoreszenz (links Insulin-EGFP, rechts Insulin-tdimer). Während bei Verwendung von tdimer die Interferenz mit der zellulären Autofluoreszenz ohnehin gering war, war bei der transienten Transfektion von Insulin-EGFP aufgrund der höheren Signalintensität die Interferenz deutlich geringer als bei der stabilen Transfektion mit Insulin-EGFP.

Bei längerdauernder transienter Transfektion und bei stabiler Transfektion (unabhängig vom Zeitpunkt der letzten Passagierung) kommt es zu einer extragranulären Akkumulation des Labels, was die Verwendungsfähigkeit beider Konstrukte beeinträchtigt (vgl. Kapitel 4.3.3). Aufgrund der leichten Abtrennbarkeit der Fluoreszenz des Labels von der zellulären Autofluoreszenz (s. Kapitel 4.3.2) erscheint der tdimer Label sogar überlegen.

#### **4.3.5. Induzierte Veränderung des Fluoreszenzmusters von tdimer-transfizierten MIN6-Zellen**

Da beabsichtigt war, die mit Insulin-tdimer transfizierten Zellen auch bei längerfristigen Versuchen einzusetzen und hierbei nicht nur den TIRF-Modus zu verwenden, sondern auch die die gesamte Zelle erfassende konventionelle Epifluoreszenz, wurde geprüft, ob eine längerdauernde Exposition gegenüber der Fluoreszenzanregung die Charakteristika des Labels beeinflusst. Hierfür wurden die gleichen Versuchsbedingungen gewählt, wie sie für die Messung der cytosolischen Calciumkonzentration verwendet wurden. Unterschiedlich waren die Anregungswellenlänge und vor allem die Belichtungszeit. Es zeigte sich regelmäßig nach ca. 15 - 20minütiger Versuchsdauer mit konstanter Belichtung, dass es in der Nähe des Zellkerns zur Intensivierung der Fluoreszenz mit einem grobscholligen - flächigen Muster kam (Abb. 4.17).



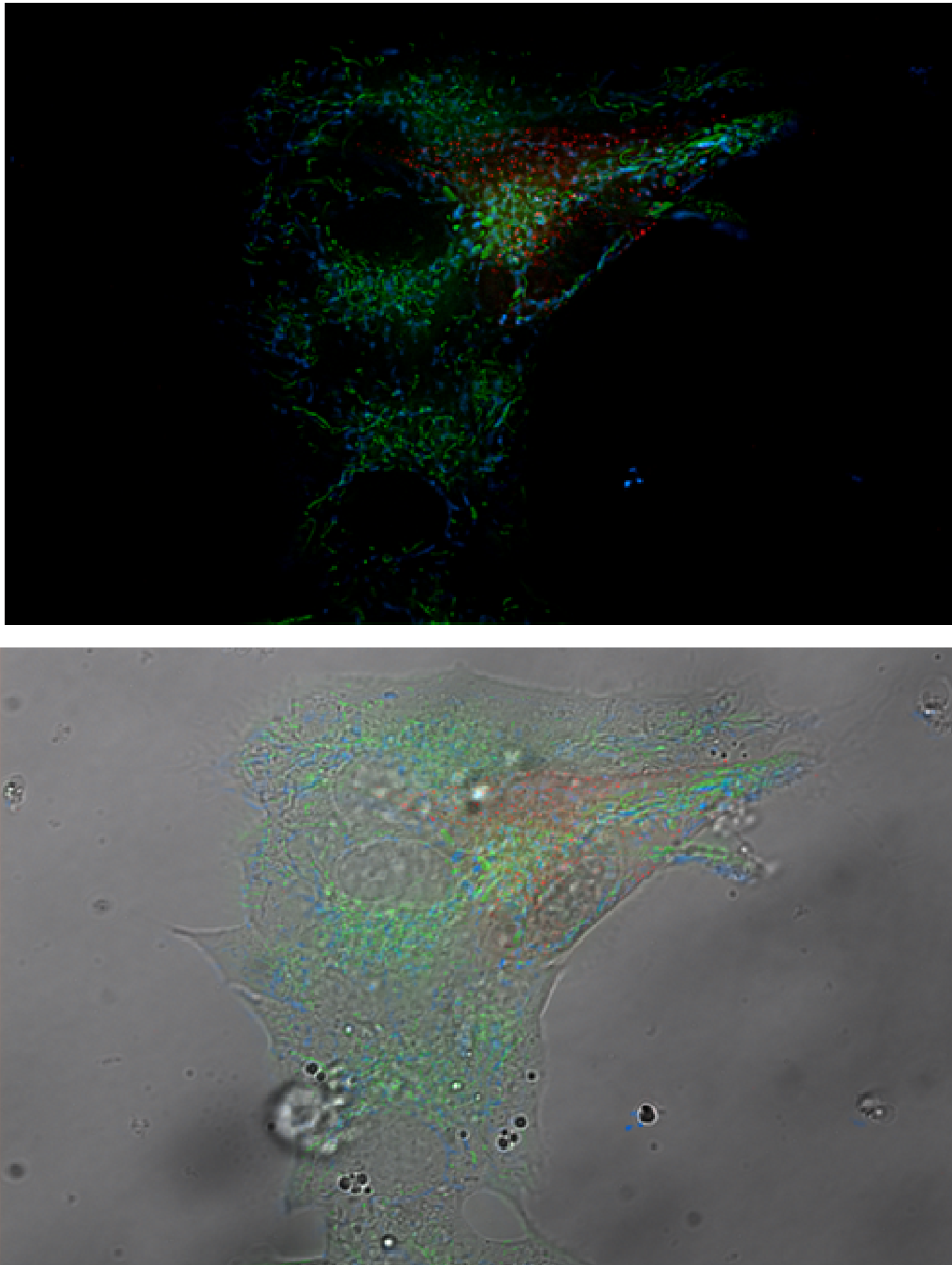
**Abb. 4.17 Induzierte Veränderung des Fluoreszenzmusters bei tdimer-transfizierten MIN6-Zellen.** Bei tdimer-transfizierten MIN6-Zellen zeigte sich im Laufe eines Versuchs eine charakteristische Veränderung des Fluoreszenzmusters, die darin bestand, dass in einem Bereich in der Nähe des Zellkerns grobschollige intensiv fluoreszierende Aggregate auftraten. Diese Veränderung trat nur bei transfizierten Zellen auf, waren also nicht als induzierte Autofluoreszenz anzusprechen. In der Abbildung A ist der Zustand zu Beginn eines Versuchs gezeigt, B zeigt die deutliche Aggregation nach 35 Minuten Versuchsdauer (entsprechend 15 Minuten Belichtung). In C ist der Zustand nach 35 Minuten Permeabilisierung gezeigt. Das fluoreszierende Material in B befand sich also nicht mehr in einem membranär umschlossenen Kompartiment.

Wurden solche Zellen mit Digitonin permeabilisiert, löste sich diese Fluoreszenz innerhalb von 20 - 30 Minuten auf, entsprach also nicht mehr intragranulär lokalisiertem Material. Durch Variation der Belichtungsdauer - und -frequenz ließ sich eine Abhängigkeit dieses Phänomens von der Fluoreszenzanregung nachweisen. (nach ca. acht Minuten Belichtungsdauer begann die Ausbildung der beschriebenen Fluoreszenz). Zellen, die ohne Fluoreszenzanregung für die Dauer eines Versuchs mit reinem Krebs-Ringer-Medium umströmt wurden zeigten keine fluoreszierenden

Aggregate in der kernnahen Region. Andererseits wirkten auch  $\beta$ -Zell Stimuli wie 500  $\mu$ M Tolbutamid oder 40 mM KCl beschleunigend, so dass auch physiologische Ereignisse der Stimulus-Sekretions-Kopplung, vor allem eine Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration einwirken können. Beschleunigend wirkte auch CCCP (10  $\mu$ M), ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung. Zusammen mit der umschriebenen Lokalisation führt die Wirksamkeit des Entkopplers zu der Hypothese, dass in der Nähe der Mitochondrien ein Milieu entsteht, das die Freisetzung des Insulin-tdimer-Fusionsproteins aus den Granula fördert. Diese Reaktion war nicht spezifisch für das tdimer Konstrukt, sondern ließ sich auch mit dem Insulin-EGFP Konstrukt nachweisen.

#### **4.3.6. Abgrenzung der mitochondrialen Eigenfluoreszenz von der granulären Fluoreszenz des Insulin-tdimer-Fusionsproteins**

Aufgrund der im vorangegangenen Abschnitt dargestellten möglichen Wirkung der Mitochondrien auf die granuläre Lokalisation des Fluoreszenzlabels und aufgrund der in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Autofluoreszenz sollte die Rolle der Mitochondrien für die Entstehung der Autofluoreszenz näher charakterisiert werden. Dafür wurden transient transfizierte MIN6-Zellen verwendet. Zunächst wurde die tdimer Fluoreszenz aufgenommen, dann, nach Filterwechsel, die Autofluoreszenz. Bei weiterhin unveränderter Lage der Zellen in der Durchflußkammer wurde die Beladung mit dem mitochondrialen Indikator Rhodamin123 durchgeführt und anschließend das mitochondriale Fluoreszenzmuster aufgenommen. Die Übereinanderprojektion (Overlay) bestätigte im Durchlichtbild die stabile Zellposition. Daher war die beobachtete Co-Lokalisation als aussagefähig aufzufassen. Die Autofluoreszenz war im Wesentlichen mit den Rhodamin123 markierten Mitochondrien co-lokalisiert, nicht aber die tdimer-markierten Granula (Abb. 4.18). Es ist also bei der Autofluoreszenz im wesentlichen von einem mitochondrialen Ursprung auszugehen. Darüberhinaus war ein Wesentlicher Teil der Rhodamin123 markierten Mitochondrien in der Nähe des Zellkerns befindlich, was die in Kapitel 4.3.5 entwickelte Hypothese unterstützt, dass die in diesem Bereich vorkommende Freisetzung von tdimer im Laufe eines Versuchs durch mitochondriale Reaktionen ( $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung oder Produktion reaktiver Sauerstoffspezies) bedingt ist.

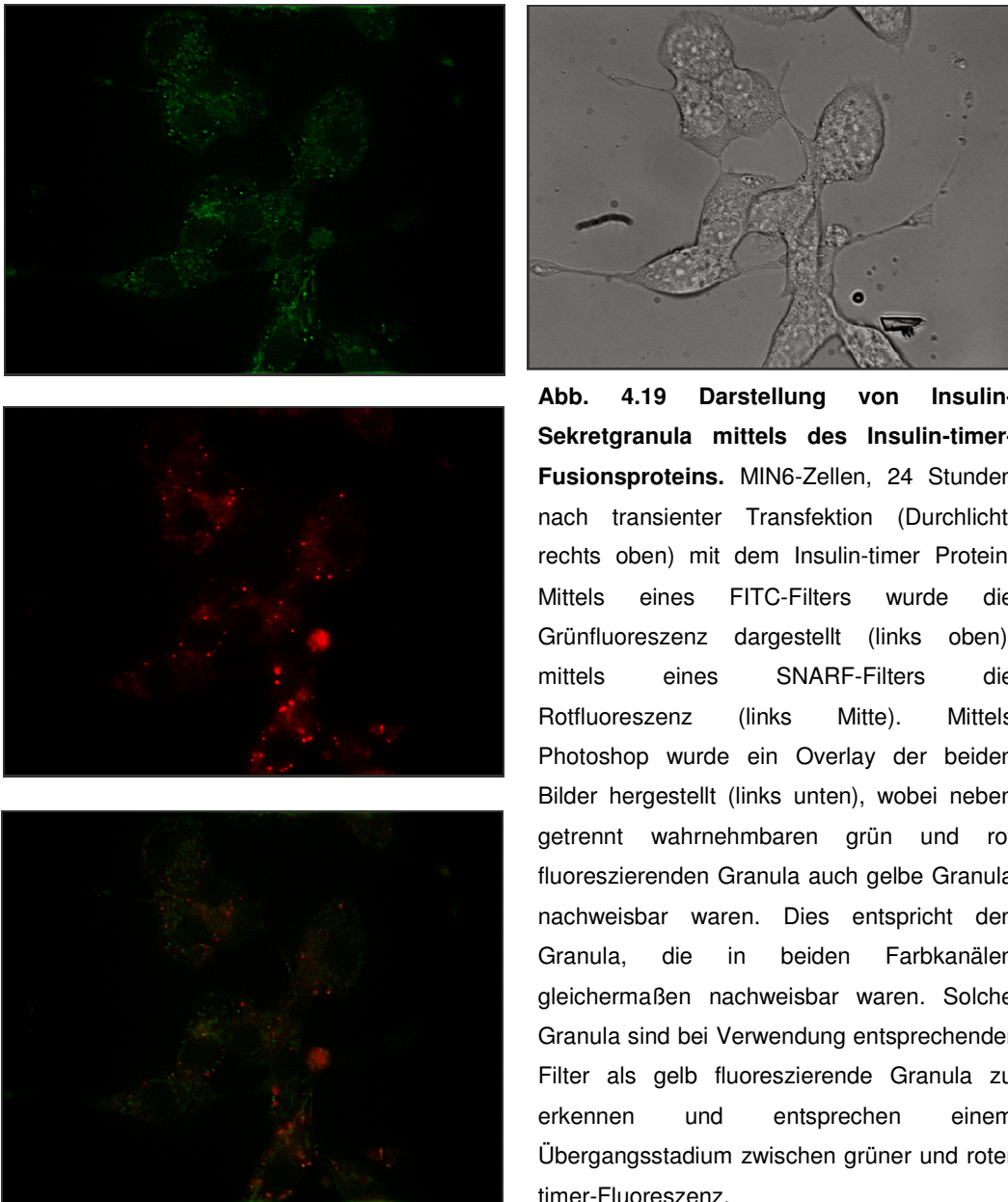


**Abb. 4.18 Co-Lokalisation von Mitochondrien und zellulärer Autofluoreszenz.** Von transient transfizierten MIN6-Zellen wurde zunächst ein fluoreszierender Zellcluster ausgesucht und die tdimer-Fluoreszenz, sowie nach Wechsel der Filter, die Autofluoreszenz dokumentiert. Danach wurde das Medium gegen ein solches mit dem mitochondrialen Indikator Rhodamin123 in der Umströmungskammer getauscht, und nach einer Beladungszeit von 10 Minuten die grün fluoreszierenden Mitochondrien abgebildet. In der Überlagerung der drei Bilder (oben) ergibt sich eine deutlich Co-Lokalisation der Autofluoreszenz (blau) mit der mitochondrialen Fluoreszenz (grün). Das untere Bild zeigt die Projektion der drei Fluoreszenzbilder auf ein Durchlichtbild der MIN6-Zellen.



#### 4.4. Fluoreszierendes Insulin-timer-Fusionsprotein als Marker für Insulin-Sekretgranula

Um weitere Einsichten in die Regulation der Insulinsekretion zu gewinnen, ist die Abschätzung des Alters der Sekretgranula wichtig. Deshalb wurde auch ein Vektor mit dem „timer-Protein“ generiert, das in Abhängigkeit von der Expressionsdauer die Fluoreszenz von grün nach rot ändert.

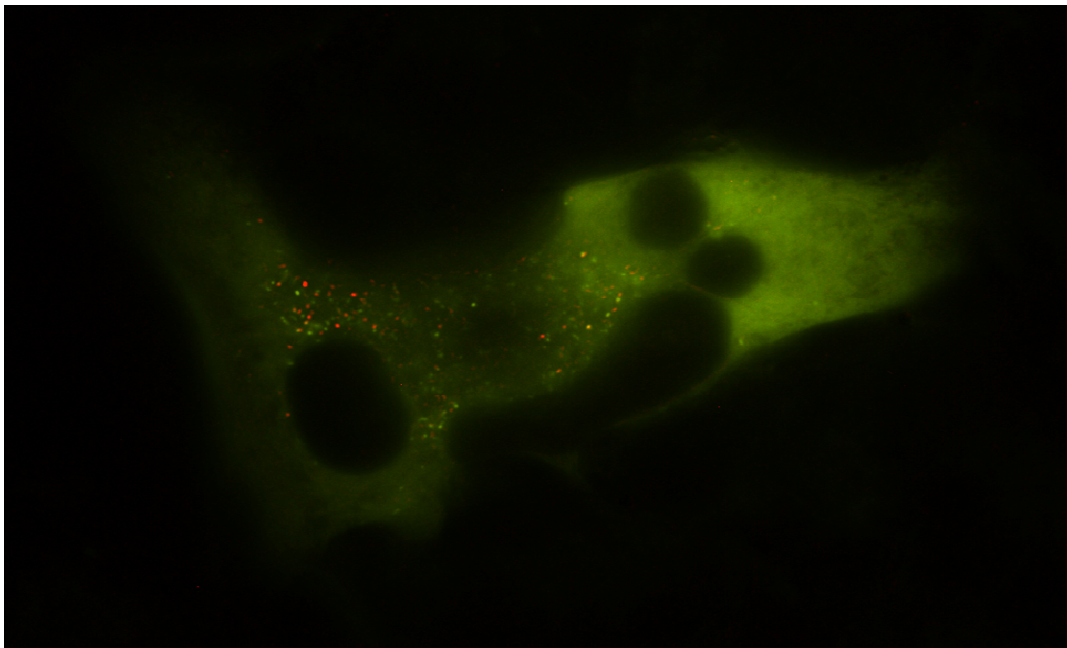


**Abb. 4.19 Darstellung von Insulin-Sekretgranula mittels des Insulin-timer-Fusionsproteins.** MIN6-Zellen, 24 Stunden nach transients Transfektion (Durchlicht, rechts oben) mit dem Insulin-timer Protein. Mittels eines FITC-Filters wurde die Grünfluoreszenz dargestellt (links oben), mittels eines SNARF-Filters die Rotfluoreszenz (links Mitte). Mittels Photoshop wurde ein Overlay der beiden Bilder hergestellt (links unten), wobei neben getrennt wahrnehmbaren grün und rot fluoreszierenden Granula auch gelbe Granula nachweisbar waren. Dies entspricht den Granula, die in beiden Farbkanälen gleichermaßen nachweisbar waren. Solche Granula sind bei Verwendung entsprechender Filter als gelb fluoreszierende Granula zu erkennen und entsprechen einem Übergangsstadium zwischen grüner und roter timer-Fluoreszenz.

24 Stunden nach transients Transfektion zeigte sich in MIN6-Zellen eine der Insulin-EGFP entsprechende feingranuläre Fluoreszenz (Abb. 4.19). Nach Wechsel des Filters war die Rotfluoreszenz des Insulin-timer Proteins darstellbar. Es fiel auf, dass

viele der rot fluoreszierenden (daher älteren) Granula größere Durchmesser hatten. Die Anzahl der grünen (also jüngeren) Sekretgranula betrug mehr als das Doppelte der roten Sekretgranula, wobei die unterschiedlichen Durchmesser der Granula darauf deuteten, dass mit zunehmendem Alter anscheinend vermehrt Umbauvorgänge in den Granula stattfanden. Ob diese als unphysiologisch zu werten sind ist noch unklar. Wurden die Bilder der Grün- und Rotfluoreszenz übereinander projiziert so stellten sich die in beiden Aufnahmen darstellbaren Granula gelb dar. Dieser Anteil war jedoch sehr gering ( $< 5\%$ ).

Zudem fand sich eine homogene, schleierige Hintergrundfluoreszenz in praktisch allen Zellen, unabhängig davon, ob sich in den Zellen eine granuläre Fluoreszenz nachweisen ließ oder nicht (Abb. 4.20).



**Abb. 4.20 Gleichzeitiges Vorkommen einer granulären und einer homogenen Fluoreszenz nach transienter Transfektion mit dem Insulin-timer Protein.** Das Bild entstand als Overlay eines Bildes, das mit einem für EGFP optimierten Filterblock aufgenommen war, und eines Bildes, das mit einem DsRed-Filterblock aufgenommen war. Ca. zwei Drittel der Granula waren grün, ein knappes Drittel war rot und eine kleine Minderheit an Granula, in beiden Bildern gleich stark dargestellt, war gelb. Dementsprechend variierte auch die homogene Hintergrundfluoreszenz zwischen grün, orange und rot.

Anscheinend liegt der homogenen Fluoreszenz die cytosolische Expression des timer-Proteins zugrunde, die dort die gleiche altersabhängige Änderung der Fluoreszenzemission zeigt. Warum es in der Mehrzahl der Zellen zum Verlust der granulären Lokalisation kommt ist unklar. In vielen Zellen mit homogener

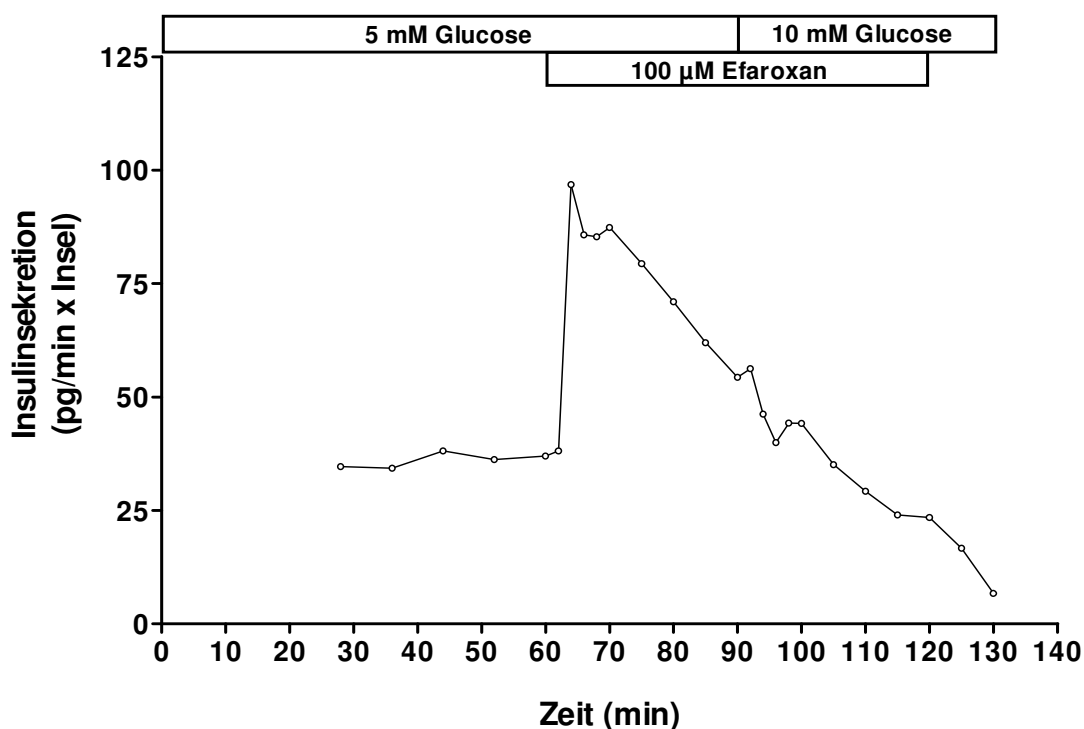
---

Fluoreszenz ist keine granuläre Fluoreszenz zu erkennen, es handelt sich also nicht um eine durch Fluoreszenzanregung induzierte Freisetzung. Mit den anderen beiden Fusionsproteinen ist ein so vollständiger Verlust der granulären Lokalisation nicht beobachtet worden.

## 4.5. Insulinsekretorische Charakteristika von Insulin-Fusionsproteinen in transfizierten MIN6-Zellen

### 4.5.1. Insulinsekretion von MIN6-Pseudoinseln

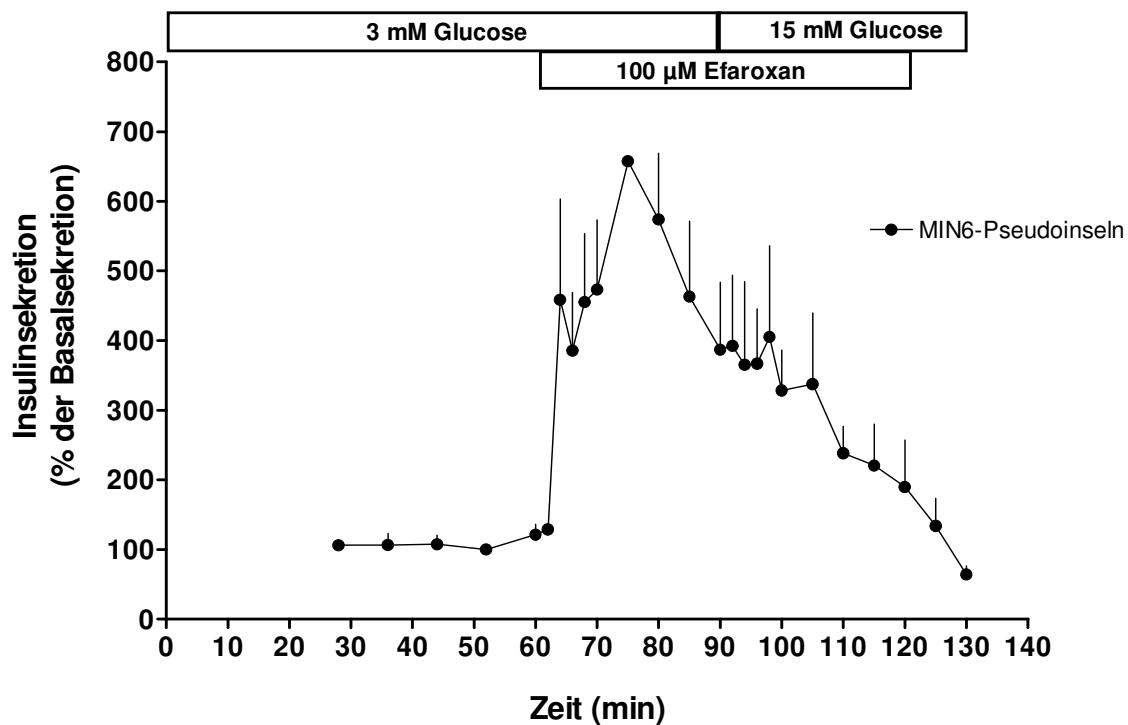
Um die sekretorische Kompetenz der transfizierten MIN6-Zellen zu testen wurden die Wachstumsbedingungen der MIN6-Zellen so gestaltet, dass sie als sogenannte Pseudoinseln wuchsen (s. Kapitel 3.2.7). Die Pseudoinseln wurden dann analog zu NMRI-Mausinseln umströmt (s. Kapitel 3.13). Es zeigte sich hierbei allerdings, dass eine direkte Übernahme des Stimulationsprotokolls für NMRI-Inseln nicht möglich war, da die Pseudoinseln eine höhere Glucoseempfindlichkeit aufwiesen. Daher lag mit 5 mM Glucose bereits ein stimuliertes Sekretionsniveau vor (Abb. 4.21).



**Abb. 4.21 Insulinsekretion von umströmten MIN6-Pseudoinseln.** 50 MIN6-Pseudoinseln wurden unter gleichen Bedingungen wie frisch isolierte NMRI-Maus Pankreasinseln umströmt, d.h., zunächst mit Krebs-Ringer-Medium mit 5 mM Glucose. Ab Minute 60 war 100 µM Efaroxan anwesend und in fortdauernder Anwesenheit von Efaroxan wurde die Glucose bei Minute 90 auf 10 mM erhöht. Von Minute 120 bis zum Versuchsende wurde die Stimulation nur mit 10 mM Glucose durchgeführt. Dargestellt sind die Werte eines Einzelversuchs.

Die Beobachtung, dass 100 µM Efaroxan einen atypischen Effekt hatte, nämlich eine sofort einsetzende Sekretionserhöhung auslöste, die dann von einem andauernden

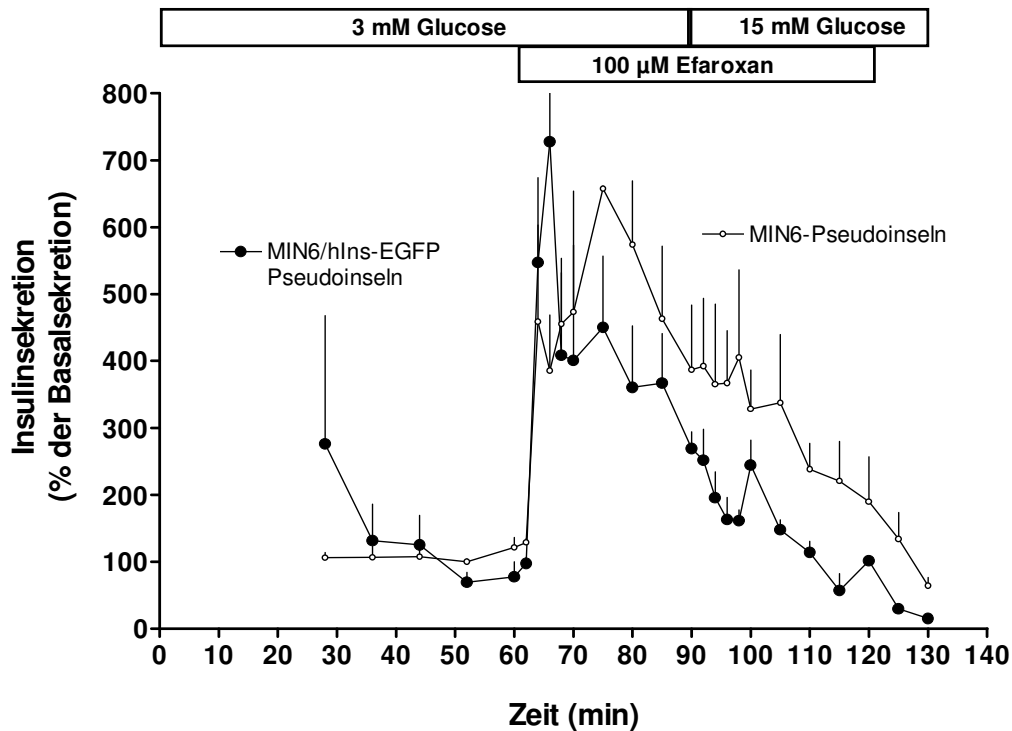
Sekretionsabfall abgelöst wurde, schien zuerst durch diese höhere Glucoseempfindlichkeit bedingt zu sein (Abb. 4.21). Allerdings war auch bei einer Absenkung der basalen Glucosekonzentration auf 3 mM und eine Erhöhung der stimulatorischen Konzentration auf 15 mM kein prinzipiell anderes Sekretionsverhalten zu beobachten (Abb. 4.22). Efaroxan steigerte die Sekretion auch bei einer substimulatorischen Glucosekonzentration. Die Sekretion war wiederum durch Erhöhung der Glucosekonzentration nicht dauerhaft zu steigern, vielmehr setzt sich der nach Erreichen des Maximalwerts einsetzende Rückgang praktisch parallelverschoben fort (Abb. 4.22).



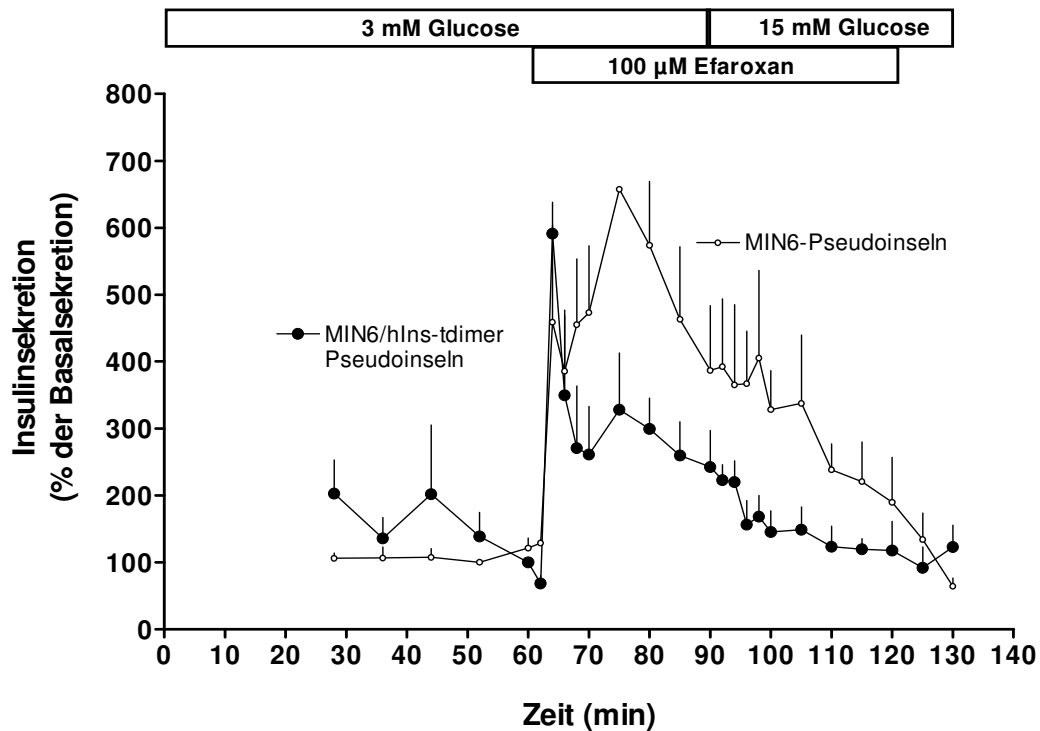
**Abb. 4.22 Insulinsekretion von umströmten MIN6-Pseudoinseln.** 50 MIN6-Pseudoinseln wurden zunächst mit Krebs-Ringer-Medium mit 3 mM Glucose umströmt. Ab Minute 60 war 100 µM Efaroxan anwesend und in fortdauernder Anwesenheit von Efaroxan wurde die Glucose bei Minute 90 auf 15 mM erhöht. Von Minute 120 bis zum Versuchsende wurde die Stimulation nur mit 15 mM Glucose durchgeführt. Der Wert der Basalsekretion zum Zeitpunkt Minute 52, der = 100% gesetzt wurde, betrug  $10,3 \pm 4,2$  pg/min x Insel. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4 unabhängigen Versuchen.

#### **4.5.2. Insulinsekretion von transfizierten MIN6–Pseudoinseln**

Nach Charakterisierung des Sekretionsverhaltens von MIN6-Pseudoinseln wurde das Sekretionsverhalten von Pseudoinseln getestet, die aus transfizierten MIN6-Zellen bestanden. Diese MIN6-Zellen waren zum einen mit dem Fusionsprotein aus humanem Insulin und EGFP und zum anderen mit dem Fusionsprotein aus humanem Insulin und tdimers stabil transfiziert. Beide Arten von Pseudoinseln ergaben ein ähnliches Reaktionsmuster (Abb. 4.23 und Abb. 4.24). Mit der Zugabe von 100  $\mu$ M Efaroxan zum Umströmungsmedium mit basaler Glucosekonzentration (3 mM) wurde ein praktisch sofortiger Sekretionsanstieg ausgelöst, der innerhalb von sechs Minuten zu einem Maximalwert führte. Nicht nur die Kinetik, auch das Ausmaß der Sekretionssteigerung waren ähnlich. Der Spitzenwert betrug das 6 (Insulin-tdimers-transfiziert) - 7fache (Insulin-EGFP-transfiziert) des Basalwerts, danach war ein angedeutetes Plateau mit der Hälfte der Maximalraten zu beobachten. In beiden Fällen führte die Erhöhung der Glucosekonzentration nicht zur Steigerung der Sekretion, vielmehr war am Ende der Umströmung mit 15 mM Glucose das prästimulatorische Niveau praktisch wieder erreicht.



**Abb. 4.23 Insulinsekretion von umströmten transfizierten Pseudoinseln.** 50 MIN6-Pseudoinseln aus Insulin-EGFP-transfizierten MIN6-Zellen wurden zunächst mit Krebs-Ringer-Medium mit 3 mM Glucose umströmt. Ab Minute 60 war 100 µM Efaroxan anwesend und in fortdauernder Anwesenheit von Efaroxan wurde die Glucose bei Minute 90 auf 15 mM erhöht. Von Minute 120 bis zum Versuchsende wurde die Stimulation nur mit 15 mM Glucose durchgeführt. Der Wert der Basalsekretion zum Zeitpunkt Minute 62, der = 100% gesetzt, wurde betrug  $4,5 \pm 3,0$  pg/min  $\times$  Insel. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 5 unabhängigen Versuchen. Zum besseren Vergleich wurden die Ergebnisse mit den nicht transfizierten Pseudoinseln in die Graphik aufgenommen.

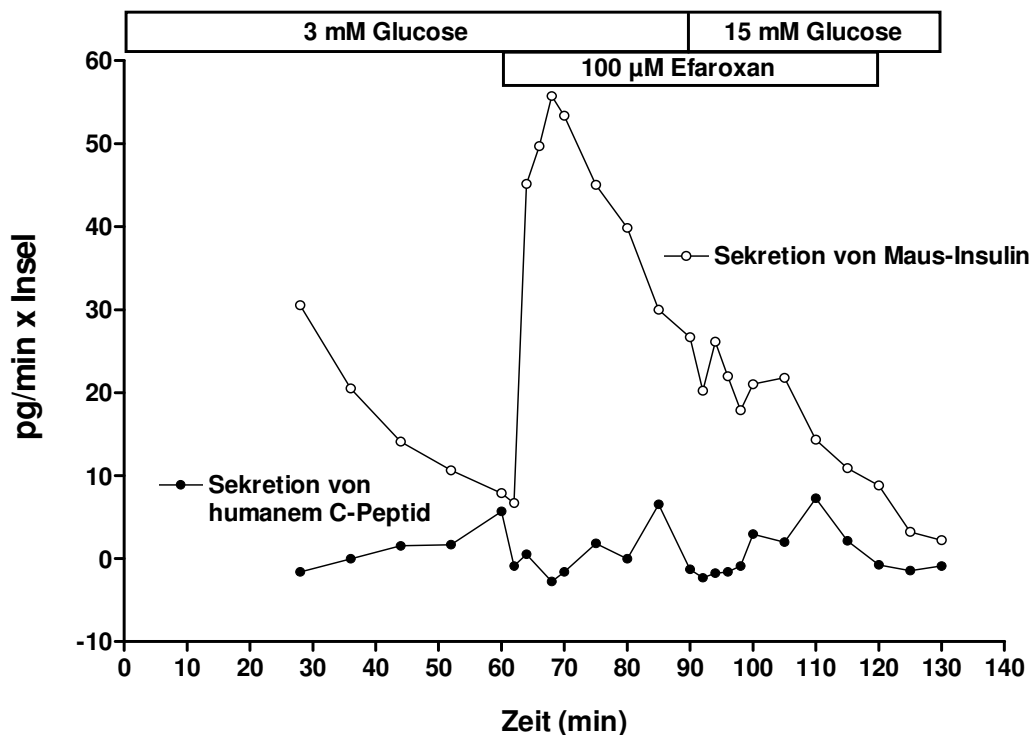


**Abb. 4.24 Insulinsekretion von umströmten transfizierten Pseudoiseln.** 50 MIN6-Pseudoiseln aus Insulin-tdimer transfizierten MIN6-Zellen wurden zunächst mit Krebs-Ringer-Medium mit 3 mM Glucose umströmt. Ab Minute 60 war 100 µM Efaroxan anwesend und in fortdauernder Anwesenheit von Efaroxan wurde die Glucose bei Minute 90 auf 15 mM erhöht. Von Minute 120 bis zum Versuchsende wurde die Stimulation nur mit 15 mM Glucose durchgeführt. Der Wert der Basalsekretion zum Zeitpunkt Minute 60, der = 100% gesetzt wurde, betrug  $9,12 \pm 3,5$  pg/min x Insel. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 5 unabhängigen Versuchen. Zum besseren Vergleich wurden die Ergebnisse mit den nicht transfizierten Pseudoiseln in die Graphik aufgenommen.



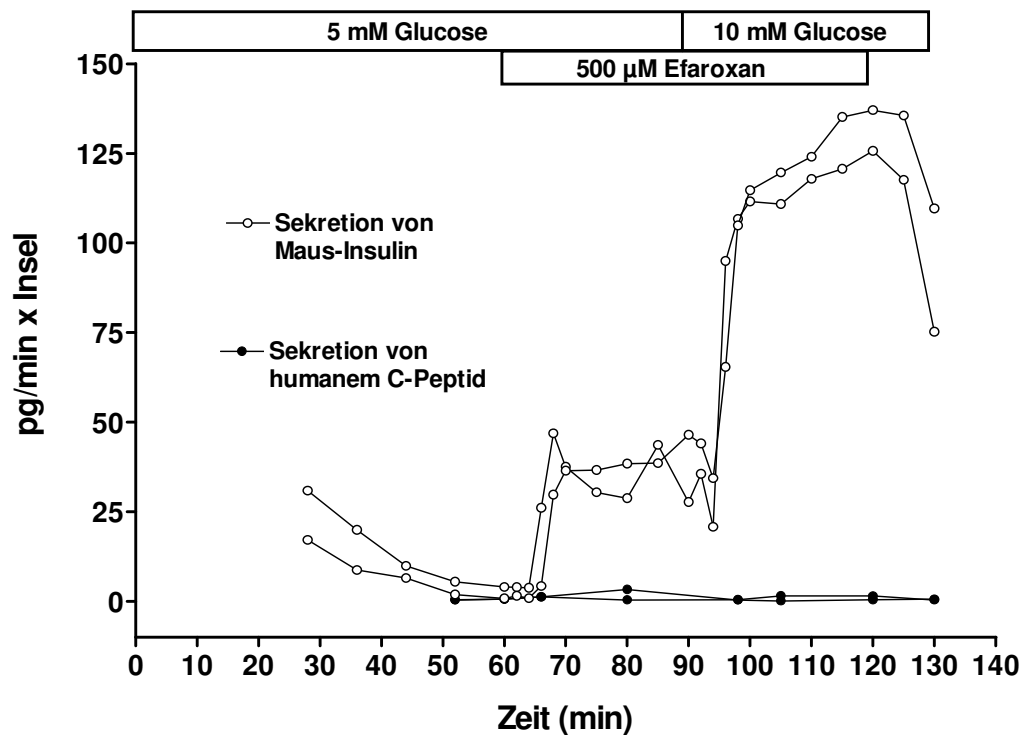
#### 4.6. Charakterisierung der C-Peptid-Sekretion von transfizierten MIN6-Zellen

Parallel zur Bestimmung der Insulinsekretion von MIN6-Pseudoinseln (s. Kapitel 4.5) sollte auch deren C-Peptid-Sekretion bestimmt werden. Der dort verwendete Insulin-ELISA zeigt eine deutliche Kreuzreaktivität mit Humaninsulin, so dass bei Insulin-EGFP oder -tdimer transfizierten MIN6-Pseudoinseln das erfasste Insulin sowohl endogenen als auch exogenen Ursprungs sein konnte. Die Bestimmung des humanen C-Peptids sollte Aufschluss darüber geben, wie viel der Anteil des durch Überexpression gebildeten humanen Insulin-Fusionsproteins am Gesamtinsulingehalt ausmacht, da das C-Peptid physiologischer Weise gemeinsam und zu gleichen Teilen mit Insulin ausgeschüttet wird. In den Perifusionsfraktionen, in denen vorher der Insulingehalt gemessen worden war, wurde deshalb der Gehalt an humanem C-Peptid bestimmt. Es zeigte sich jedoch, dass die Konzentration des humanen C-Peptids an der Nachweisgrenze lag (Abb. 4.25).



**Abb. 4.25 Sekretion Insulin und humanem C-Peptid von umströmten transfizierten MIN6-Pseudoinseln.** 50 MIN6-Pseudoinseln aus Insulin-tdimer transfizierten MIN6-Zellen wurden zunächst mit Krebs-Ringer-Medium mit 3 mM Glucose umströmt. Ab Minute 60 war 100 µM Efaroxan anwesend und in fortdauernder Anwesenheit von Efaroxan wurde die Glucose bei Minute 90 auf 15 mM erhöht. Von Minute 120 bis zum Versuchsende wurde die Stimulation nur mit 15 mM Glucose durchgeführt. Dargestellt sind die Werte eines Einzelversuchs.

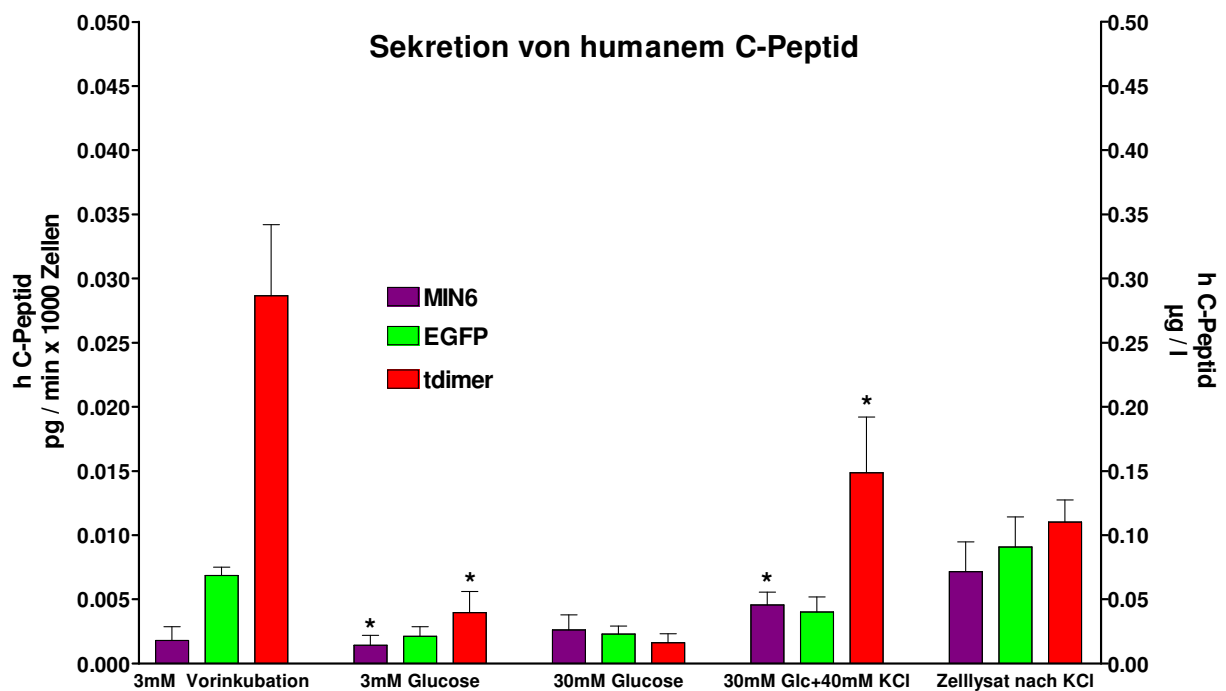
Deshalb wurde der Versuch, aus der gleichen Probe den Insulingehalt und den Gehalt an humanem C-Peptid zu bestimmen, mit statischen Inkubationen von MIN6-Zellen wiederholt. Zuvor wurde, um die Spezifität des C-Peptid ELISA für humanes C-Peptid zu prüfen, die Fraktionen eines Perifusionsversuches von Maus-Inseln gemessen, in dem ein starker Anstieg der Maus-Insulin Sekretion zu verzeichnen war (Abb. 4.26). Es zeigte sich, dass in den Fraktionen, in denen ein hoher Gehalt an Maus Insulin vorlag, keine Reaktivität mit dem humanen C-Peptid ELISA bestand (Abb. 4.26). Es konnte daher angenommen werden, dass mit diesem ELISA keine Kreuzreaktivität mit Maus Insulin und Maus C-Peptid bestand.



**Abb. 4.26 Sekretion von Insulin und humanem C-Peptid von umströmten NMRI Maus-Inseln.** 50 Inseln wurden zunächst mit Krebs-Ringer-Medium mit 5 mM Glucose umströmt. Ab Minute 60 war 500 µM Efaroxan anwesend und in fortdauernder Anwesenheit von Efaroxan wurde die Glucose bei Minute 90 auf 10 mM erhöht. Von Minute 120 bis zum Versuchsende wurde die Stimulation nur mit 10 mM Glucose durchgeführt. Dargestellt sind die Werte von zwei Einzelversuchen. In keiner Probe war der C-Peptid Gehalt über dem der niedrigsten Standardkonzentration.

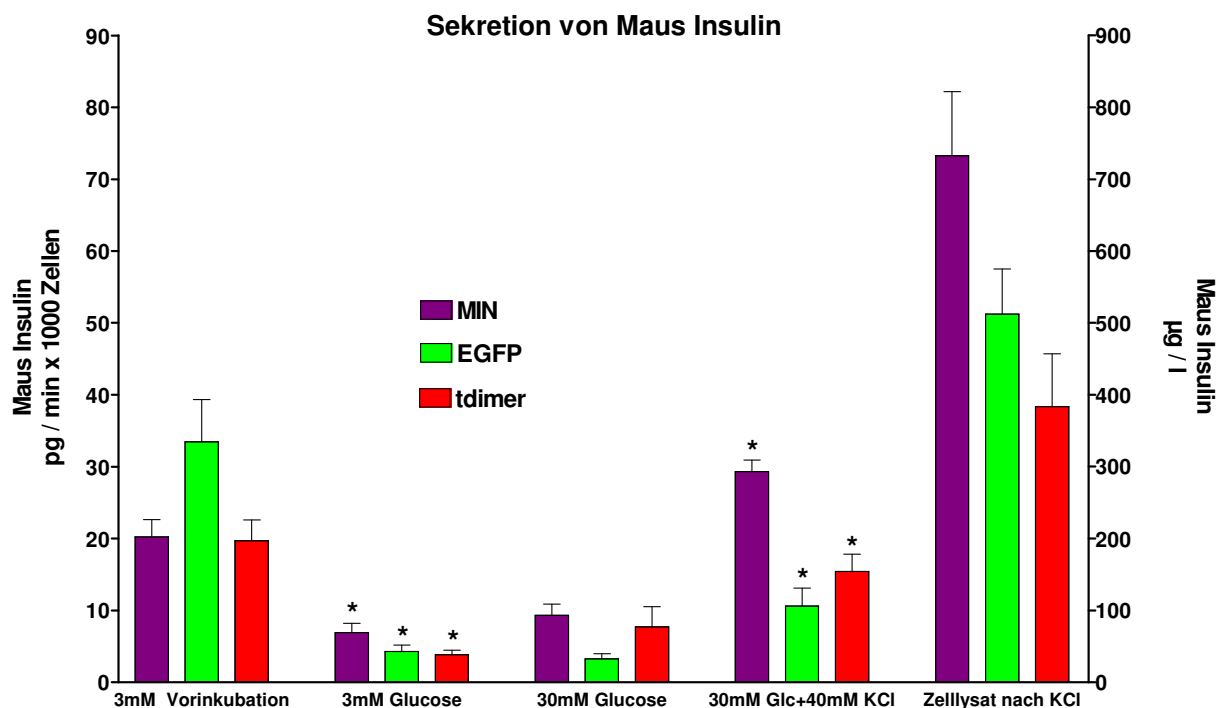
Bei der Durchführung statischer Inkubationen von transfizierten MIN6-Zellen bestätigte sich, dass nur eine sehr geringe Reaktivität mit dem C-Peptid ELISA bestand. Die nachweisbare Konzentration lag um den Faktor 1000-10000 niedriger als die des unter gleichen Bedingungen ausgeschütteten Insulins (Abb. 4.27).

Es wäre eigentlich zu erwarten gewesen, dass hier mehr humanes C-Peptid als Maus-Insulin im Medium nachweisbar ist, da die Expression des Fusionsproteins durch einen starken unregulierten CMV-Promotor getrieben wird. Die Reaktionsmuster waren erstaunlicher Weise sowohl bei den Kontroll-MIN6-Zellen als auch bei den EGFP- und tdimer-transfizierten MIN6-Zellen prinzipiell gleich. Bei der Erhöhung der Glucosekonzentration von substimulatorischer (3 mM) auf einen stark stimulatorischen Wert (30 mM) zeigte sich kein signifikanter Anstieg der C-Peptid-Sekretion. Ein signifikanter Anstieg der C-Peptid-Sekretion war erst zu beobachten, nachdem dem Medium neben der hohen Glucosekonzentration noch zusätzlich eine stark depolarisierende Konzentration an KCl (40 mM) zugesetzt wurde.



**Abb. 4.27 Sekretion von humanem C-Peptid durch statisch inkubierte MIN6-Zellen.** MIN6-Kontrollzellen und EGFP-bzw tdimer-transfizierte MIN6-Zellen wurden in Krebs-Ringer Medium, das 3 mM, 30 mM oder 30 mM Glucose + 40 mM KCl enthielt jeweils für 20 Minuten inkubiert. Zu den genannten Zeitpunkten wurde das Medium vollständig ausgetauscht und der Gehalt an humanem C-Peptid mittels ELISA bestimmt. Die Säulen zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5-6 unabhängigen Versuchen. Der C-Peptid-Gehalt der Zellysate ist auf der rechten Skala angegeben. \* =  $p < 0,05$  (zweiseitiger ungepaarter t-Test) für den Vergleich 30 mM Glucose + 40 mM KCl mit 3 mM Glucose allein.

Das gleiche Reaktionsmuster zeigte sich bei der Bestimmung von Maus-Insulin in diesen Proben, allerdings in über 1000fach höherer Konzentration (Abb. 4.28). Es ist daher möglich, dass die geringe gemessene humane C-Peptid Konzentration einer Kreuzreaktivität mit Maus-Insulin entspringt. Die Kreuzreaktivität müsste dafür lediglich in einem Bereich von 0,01 – 0,1% liegen. Eine so geringe Kreuzreaktivität ist auch mit dem fehlenden Nachweis von humanem C-Peptid in den Umströmungsversuchen (Abb. 4.26) kompatibel.

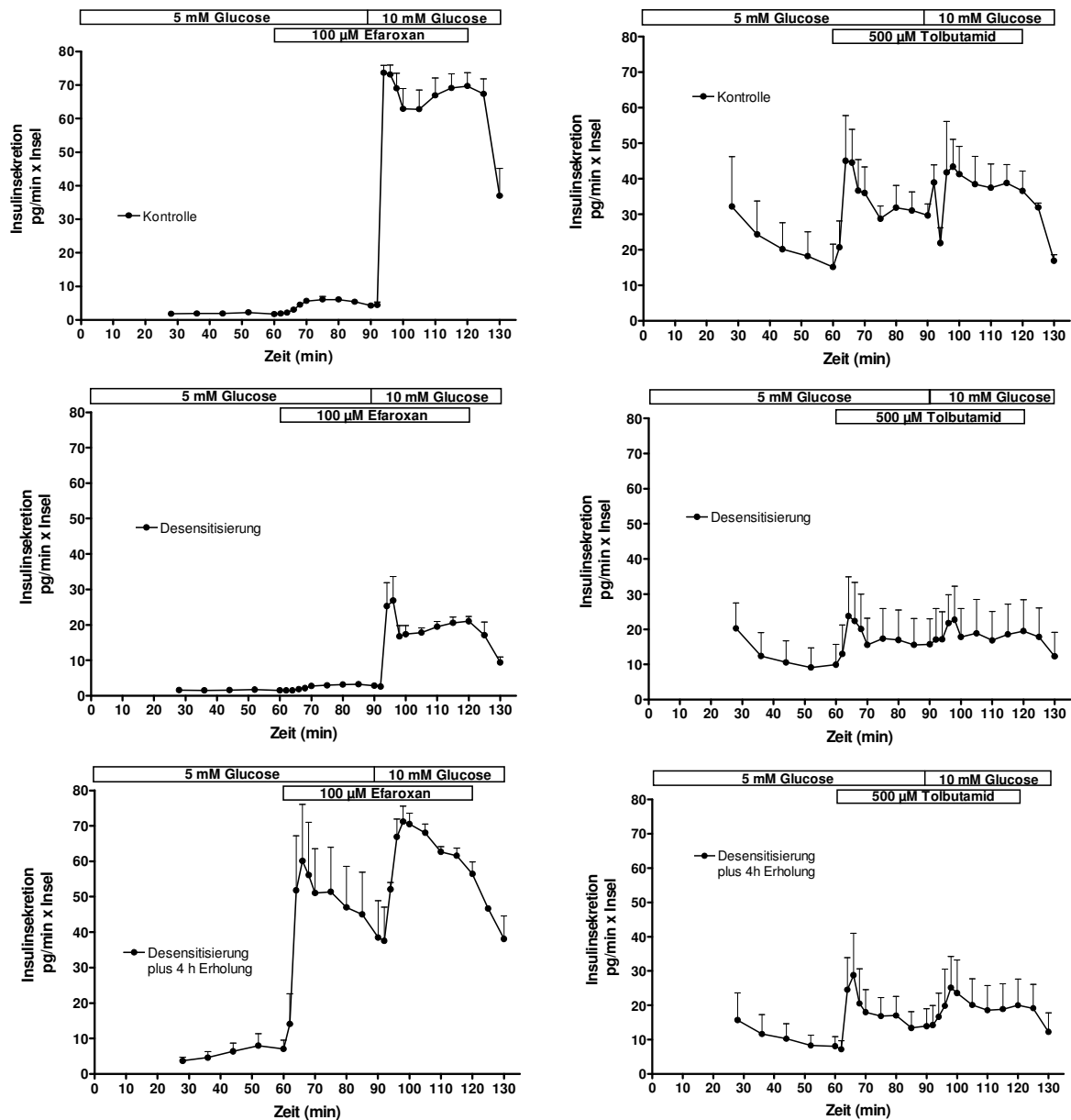


**Abb. 4.28 Sekretion von Maus Insulin durch statisch inkubierte MIN6-Zellen.** MIN6-Kontrollzellen und EGFP-bzw tdimer-transfizierte MIN6-Zellen wurden in Krebs-Ringer Medium, das 3 mM, 30 mM oder 30 mM Glucose + 40 mM KCl enthält jeweils für 20 Minuten inkubiert. Zu den genannten Zeitpunkten wurde das Medium vollständig ausgetauscht und der Gehalt an Maus Insulin mittels ELISA bestimmt. Die Säulen zeigen die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5-6 unabhängigen Versuchen. Der Insulingehalt der Zelllysate ist auf der rechten Skala angegeben. \* =  $p < 0,05$  (zweiseitiger ungepaarter t-Test) für den Vergleich 30 mM Glucose + 40 mM KCl mit 3 mM Glucose allein.

## 4.7. Desensitisierung der Insulinsekretion

### 4.7.1. Desensitisierung der Insulinsekretion durch zwei unterschiedliche Hemmstoffe des $K_{ATP}$ -Kanals

Die längerfristige Exposition von  $\beta$ -Zellen oder Inseln mit einem Stimulus führt zu einer verminderten Sekretionsantwort bei erneuter Stimulation. Dies gilt für Substanzen, die ausschließlich über die Blockade des  $K_{ATP}$ -Kanals wirken, wie auch für Nährstoffstimuli. Hier sollte nun die begonnene Charakterisierung der Desensitisierung der Insulinsekretion durch Imidazoline fortgeführt werden, indem die desensitisierende Wirkung von Efaroxan mit derjenigen von Tolbutamid verglichen wurde. Hierbei wurde Tolbutamid in einer Konzentration eingesetzt, die eine ähnlich starke Wirkung auf die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität hatte wie 100  $\mu$ M Efaroxan, nämlich eine Reduktion um 85% im whole cell Modus (BLECK 2006). Es zeigte sich, dass Tolbutamid eine deutliche Desensitisierung herbeiführte, wenn Tolbutamid-exponierte Inseln im Vergleich mit kontroll-kultivierten Inseln betrachtet wurden (Abb. 4.29 rechts oben und rechts Mitte). Die Reduktion war sowohl bei basaler Glucosekonzentration wie auch bei mäßig stimulatorischer Glucosekonzentration (10 mM) deutlich und betrug insgesamt (AUC von Minute 28 bis Minute 130) bei Efaroxan 65% und bei Tolbutamid 50%. Nach vier Stunden Erholungszeit war nur eine geringe Steigerung der Responsivität zu erkennen (Abb. 4.29 rechts unten). Diese Beobachtung unterschied sich von den mit Efaroxan gemachten Beobachtungen. Sowohl mit kontroll-kultivierten wie auch mit Efaroxan-desensitisierten Inseln war ein deutlicher Unterschied zwischen der Wirkung bei basaler und mäßig stimulatorischer Glucosekonzentration zu sehen (Abb. 4.29 links oben und links Mitte). Das Ausmaß der Desensitisierung entsprach größenordnungsmäßig der Tolbutamid-Desensitisierung. Ein drastischer Unterschied zwischen beiden Substanzen bestand allerdings in der Reaktion auf die vierstündige Erholungsphase. Während der Effekt der Erholung bei Tolbutamid gerade eben erkennbar war (Abb. 4.29 rechts unten), kam es durch die Erholung nach der Efaroxan-Desensitisierung zu einer überschießenden Sekretionsantwort, vor allem in Gegenwart der basalen Glucosekonzentration (Abb. 4.29 links unten). Die nächsten Untersuchungen sollten Aufschluss über die zugrundeliegenden Mechanismen erbringen.

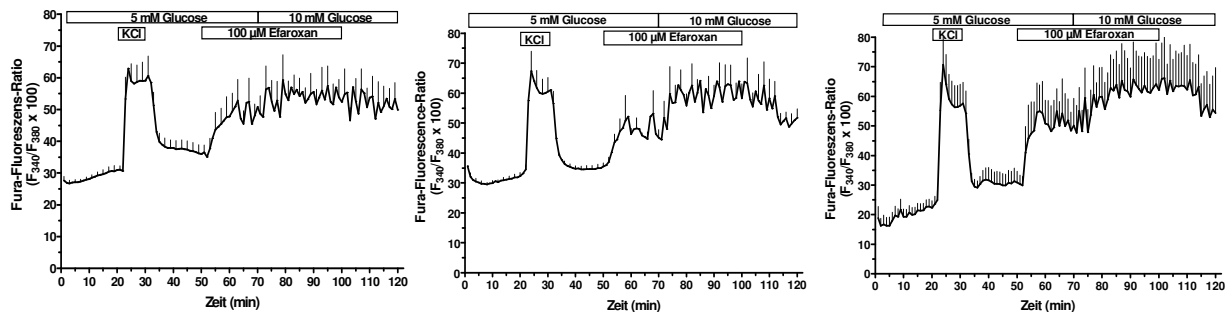


**Abb. 4.29 Vergleich der Desensibilisierung der Insulinsekretion durch Efaroxan und durch Tolbutamid.**

Isolierte NMRI-Mausinseln wurden für 20 Stunden in RPMI1640-Medium kultiviert, das 5 mM Glucose enthielt (Kontrollinkubation, obere Reihe) oder zusätzlich entweder 100 µM Efaroxan oder 500 µM Tolbutamid (mittlere Reihe). Danach wurden die Inseln entsprechend dem standardisierten Protokoll umströmt (s. z.B. Abb. 4.24), d.h. nach einer 60 minütigen Umströmung mit Krebs-Ringer-Medium mit 5 mM Glucose wurden Efaroxan (linke Graphen) bzw. Tolbutamid (rechte Graphen) hinzugefügt und nach 30 Minuten bei fortdauernder Anwesenheit beider Stimulatoren die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht. Während der letzten 10 Minuten der Umströmung war nur Glucose anwesend. Diese Art der Stimulation wurde auch mit Inseln durchgeführt, bei denen nach der 20 stündigen Zellkulturphase in Anwesenheit einer der Stimulatoren eine weitere vierstündige Phase ohne Stimulation, d. h. zum Auswaschen, angeschlossen worden war (untere Reihe). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils 4 bis 6 Versuchen. Die Versuche zur Efaroxan-Desensibilisierung sind in einem früheren Projekt entstanden und bereits publiziert.

### 4.7.2. Einfluss der Desensitisierung auf die cytosolische Calciumkonzentration

Da durch die pharmakologische Hemmung des  $K_{ATP}$ -Kanals eine Steigerung der cytosolischen Calciumkonzentration ausgelöst wird war es naheliegend, die Auswirkung der Desensitisierung und der Erholung auf die Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration zu charakterisieren. Hierfür wurden Pankreasinseln genauso vorbehandelt wie für die im vorangegangenen Kapitel dargestellten Sekretionsmessungen und dann nach Beladung mit dem Fluoreszenz-Indikator Fura-PE3/AM nach dem gleichen Protokoll stimuliert.



**Abb. 4.30 Auswirkung der Desensitisierung bzw. Erholung von der Desensitisierung auf die cytosolische Calciumkonzentration von isolierten Mausinseln.** Pankreasinseln von NMRI-Mäusen wurden für 20 Stunden in RPMI1640-Medium (links) oder zusätzlich mit 100  $\mu$ M Efaroxan (Mitte) kultiviert, danach mit dem fluoreszierenden  $Ca^{2+}$ -Indikator Fura-2/PE3 beladen und entsprechend dem Protokoll der vorangegangenen Sekretionsversuche (Abb. 4.29) umströmt. Der rechte Graph zeigt die Reaktion von Efaroxan-desensitisierten Inseln nach vierstündiger Erholung. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Versuchen.

Die desensitisierten Inseln zeigten ebenso wie die kontroll-kultivierten Inseln einen prompten Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration als Antwort auf 100  $\mu$ M Efaroxan (Abb. 4.30 links und Mitte). Durch Erhöhung der Glucosekonzentration kam es in beiden Fällen zu einer weiteren geringen Zunahme. Auch nach der vierstündigen Erholungszeit war dieses Muster zu beobachten. Der Eindruck eines etwas stärker ausgeprägten Effekts (Abb. 4.30 rechts) wird dadurch relativiert, dass auch die Kalium-Depolarisation eine etwas stärkere Antwort fand. Insgesamt ist jedoch die Antwort auf die Kalium-Depolarisation unter allen drei Bedingungen gleichartig, d.h. es kommt mit sehr schneller Kinetik zu einem Anstieg der Fura-Fluoreszenz-Ratio von 30 Einheiten (25 im Falle der Erholung) auf 60 Einheiten im steady state. Insofern scheint ein verminderter Anstieg der cytosolischen

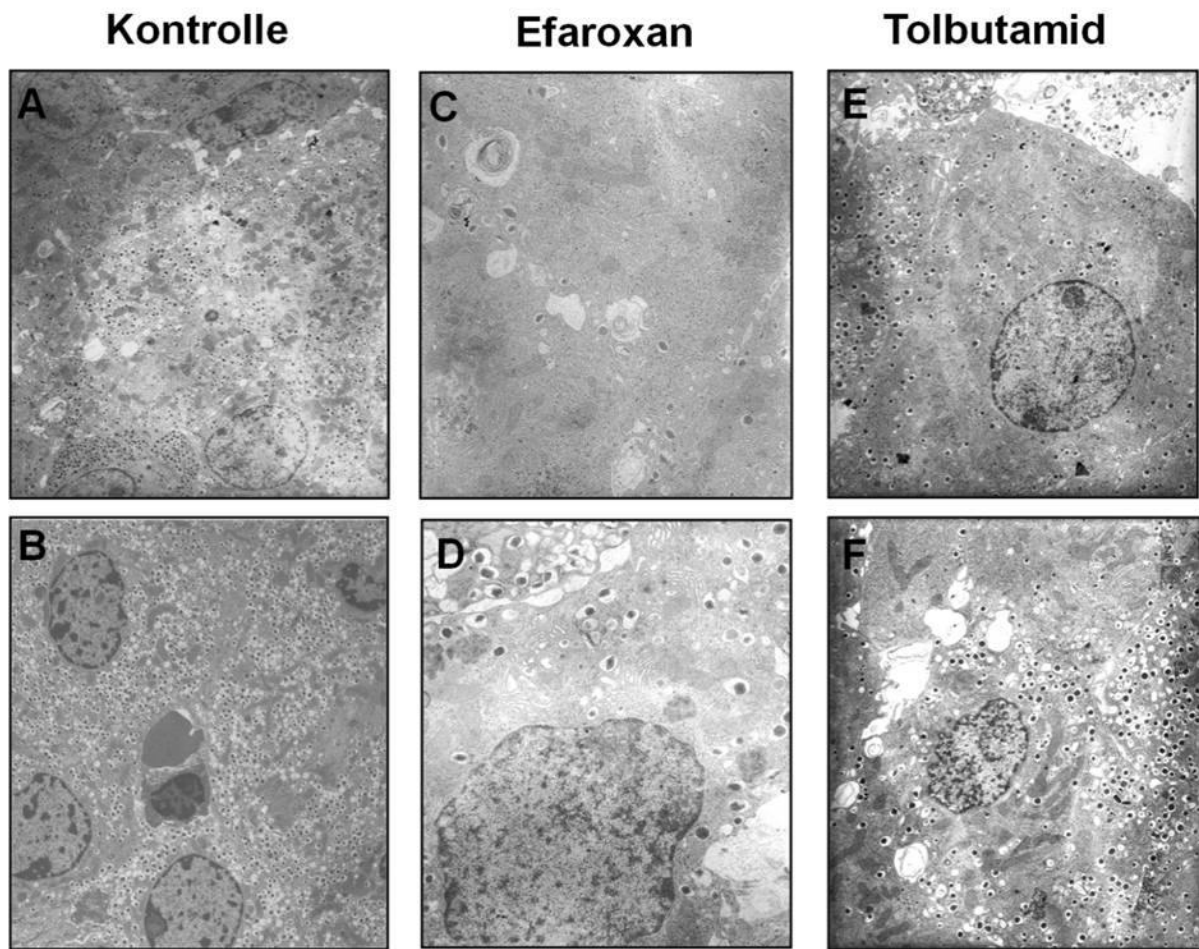
Calciumkonzentration nicht der Desensibilisierung der Sekretionsantwort zugrunde zu liegen.

#### **4.7.3. Einfluss der Desensibilisierung auf den Gehalt an Insulingranula in Mausinseln – elektronenmikroskopische Untersuchungen**

In Anbetracht der praktisch unveränderten Reaktion der cytosolischen Calciumkonzentration kann die verminderte Responsivität nach mehrstündiger Efaroxan- bzw. Tolbutamid-Exposition auch in einer verminderten Zahl sekretionsfähiger Granula ihre Ursache haben. Daher wurden Pankreasinseln über Nacht wie für die in Kapitel 4.7.1 beschriebenen Sekretionsversuche inkubiert und anschließend für die Elektronenmikroskopie fixiert. Sowohl Efaroxan als auch Tolbutamid verursachten eine starke Degranulation während die kontroll-kultivierten Inseln in ihrem Granulabestand den frisch isolierten Inseln entsprachen (Abb. 4.31). Die durch Tolbutamid ausgelöste Degranulation war eher noch stärker (ca. 85% degranulierte  $\beta$ -Zellen) als die durch Efaroxan ausgelöste Degranulation (ca. 70% degranulierte  $\beta$ -Zellen), wenngleich ein statistisch signifikanter Unterschied anhand der jeweils zwei präparierten Inselpellets nicht sinnvoll zu berechnen ist.

Nach der anschließenden vierstündigen Kultivierung ohne Efaroxan bzw. Tolbutamid (Erholungsphase) zeigte sich eine deutliche Regranulation (Abb. 4.31 D und F), die bei den Tolbutamid-exponierten  $\beta$ -Zellen eher noch ausgeprägter war als bei den Efaroxan-exponierten. Insgesamt waren zu diesem Zeitpunkt noch 30 bis 40% der  $\beta$ -Zellen als degranuliert zu beurteilen.



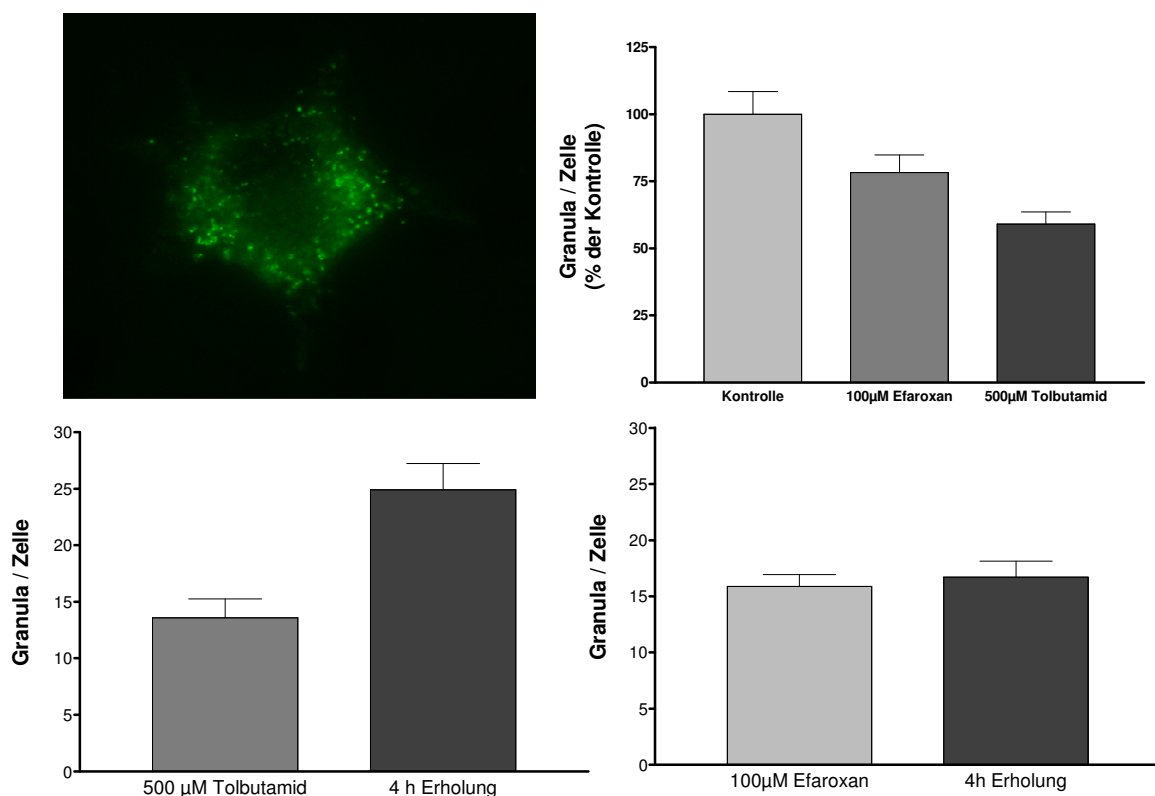


**Abb. 4.31 Wirkung von Efaroan oder Tolbutamid auf die Ultrastruktur von pankreatischen  $\beta$ -Zellen.**

Isolierte Pankreasinseln der NMRI-Maus wurden für 20 Stunden in RPMI1640 Medium kultiviert, das 5 mM Glucose enthielt. (Kontrollinkubation = A, frisch isolierte Insel zum Vergleich = B) oder zusätzlich entweder 100  $\mu$ M Efaroan (C) oder 500  $\mu$ M Tolbutamid (E). Die Inseln wurden im Anschluss in einer Lösung aus Paraformaldehyd (2%) und Di-Glutaraldehyd (2%) für die Elektronenmikroskopie fixiert. In gleicher Weise wurden Inseln behandelt, bei denen nach der 20 stündigen Zellkulturphase in Anwesenheit einer der Stimulatoren eine weitere vierstündige Phase ohne Stimulation, d. h. zum Auswaschen, angeschlossen worden war (D, F). Die Abbildungen zeigen typische Befunde für je zwei Versuche. Beide Substanzen führten zu einer hochgradigen Degranulation (C und E), nach 4 Stunden zeigte sich in beiden Fällen eine deutliche Regranulation (D und F).

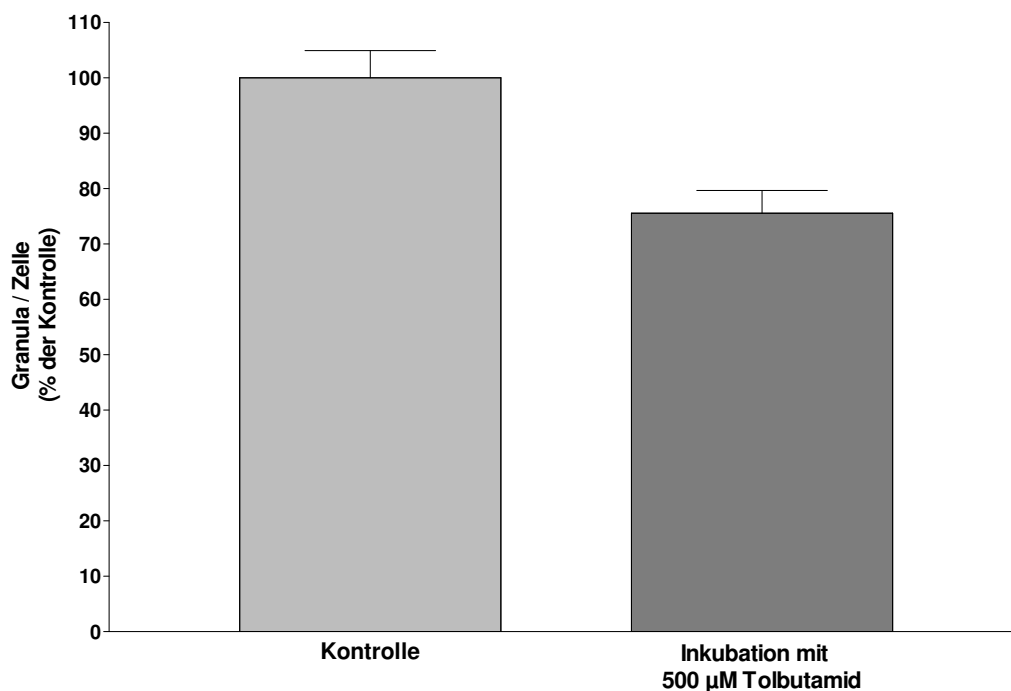
#### 4.7.4. Einfluss der Desensibilisierung auf den Granulationsstatus von MIN6-Zellen – fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Die Frage, wie weit die Desensibilisierung der Insulinsekretion durch den verminderten Granulabestand zu erklären ist, bot sich als erstes Anwendungsgebiet für die stabil mit Insulin-EGFP transfizierten MIN6-Zellen an. Wurden die MIN6-Zellen für 20 Stunden in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  Efaroxan oder 500  $\mu\text{M}$  Tolbutamid kultiviert, so zeigte sich ein signifikanter Rückgang des Granulabestandes, der für Tolbutamid noch ausgeprägter war als für Efaroxan (Abb. 4.32). Die vierstündige Erholungsphase führte bei Tolbutamid-exponierten MIN6-Zellen nahezu zu einer Verdopplung des Granulabestandes, bei Efaroxan-exponierten MIN6-Zellen war jedoch kein signifikanter Anstieg zu beobachten (Abb. 4.32).



**Abb. 4.32 Auswirkung von Efaroxan und Tolbutamid auf die Granulazahl in MIN6-Zellen, die stabil mit Insulin-EGFP transfiziert sind (oben links).** Die Zellen wurden für 20 Stunden in DMEM-Medium (5 mM Glucose) mit 100  $\mu\text{M}$  Efaroxan oder 500  $\mu\text{M}$  Tolbutamid inkubiert und die Granulazahl mittels Fluoreszenzmikroskopie der vitalen Zellen bestimmt (oben rechts). Für die Regranulation wurden Zellen für 20 Stunden unter den gleichen Bedingungen kultiviert, und anschließend für 4 Stunden in DMEM-Medium kultiviert, das nur 5 mM Glucose und keine Stimulatoren der Insulinsekretion enthielt. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mittels Fluoreszenzmikroskopie der vitalen Zellen (unten). Beide Substanzen verringerten signifikant den Granulabestand der MIN6-Zellen (oben rechts). Nach 4 Stunden Erholung regranulierten die mit Tolbutamid behandelten Zellen signifikant ( $p < 0,05$  ungepaarter zweiseitiger t-Test), (unten links), nicht aber die mit Efaroxan behandelten (unten rechts).

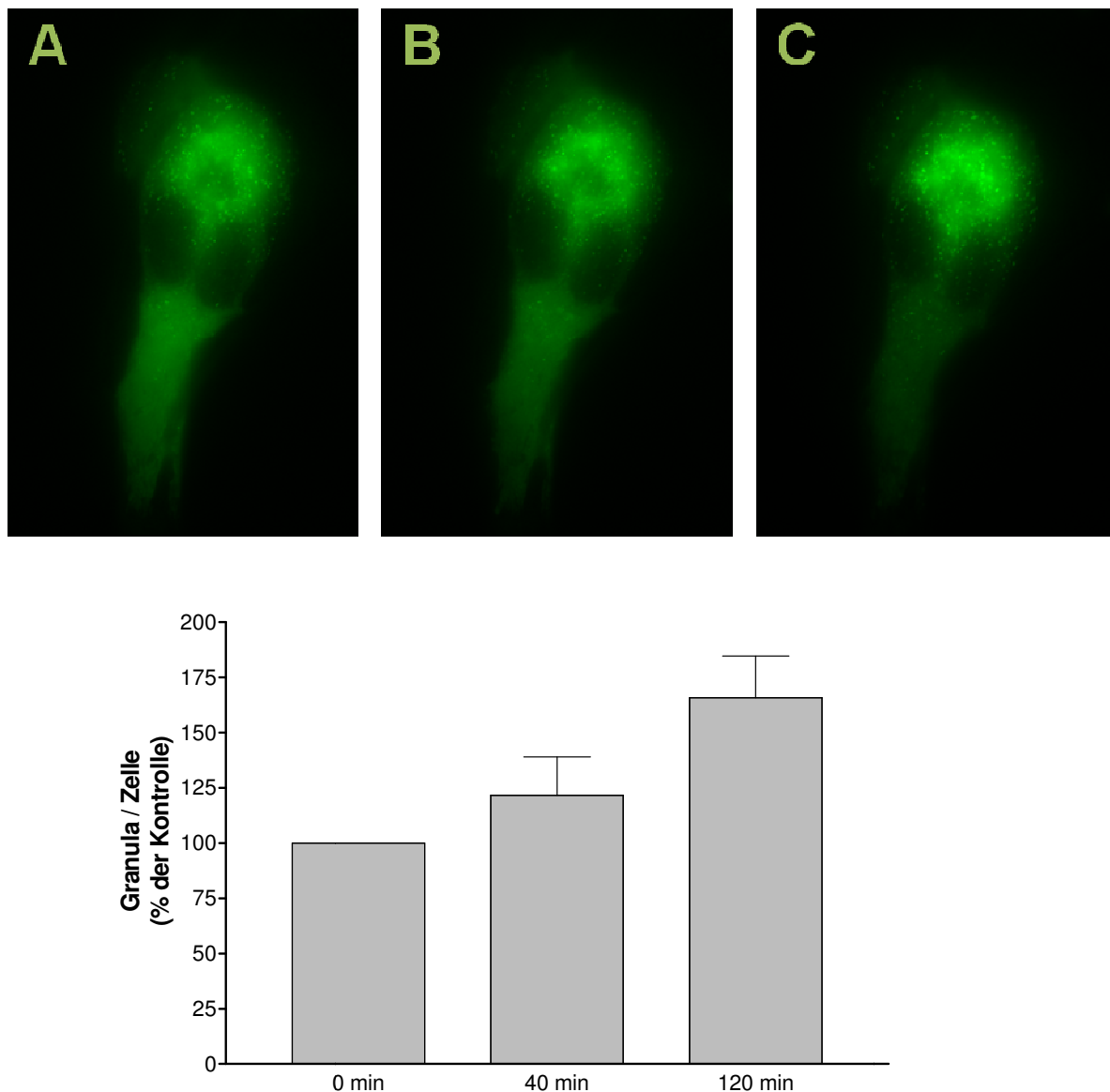
Ansichts des stark degranulierenden und schnell reversiblen Effekts von Tolbutamid tauchte die Frage auf, wie schnell dieser Effekt einsetzt. Somit wurden stabil transfizierte MIN6-Zellen statt für 20 Stunden nur für vier Stunden mit Tolbutamid kultiviert. Es zeigte sich zu diesem Zeitpunkt eine signifikante ( $p < 0,05$  ungepaarter zweiseitiger t-Test) Reduktion des Granulabestandes auf 76% (Abb. 4.33). Verglichen mit den zuvor durchgeführten Quantifizierungen des Granulabestandes sind diese Messungen als präziser anzusehen, da durch die Permeabilisierung lösliche cytosolische Aggregate ausgewaschen wurden (vgl. Kapitel 4.3.3).



**Abb. 4.33 Wirkung einer verkürzten Tolbutamid-Exposition auf den Granulabestand stabil transfizierter MIN6-Zellen.** Dem Zellkulturmedium (DMEM mit 3 mM Glucose) wurden 500 µM Tolbutamid zugesetzt und die Zellkultur für 4 Stunden fortgesetzt. Danach wurden die MIN6-Zellen, die an Deckgläschen festgewachsen waren, in eine Umströmungskammer transferiert und mittels Digitonin die Plasmamembran permeabilisiert, um die löslichen fluoreszierenden Aggregate im Cytosol auszuwaschen (s. Kapitel 4.3.3). Das gleiche Verfahren wurde mit stabil transfizierten MIN6-Zellen, die nicht Tolbutamid-exponiert waren, durchgeführt (Kontrolle). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 8 Versuchen.

#### **4.7.5. Einfluss einer Depolarisation auf den Granulationsstatus von MIN6-Zellen**

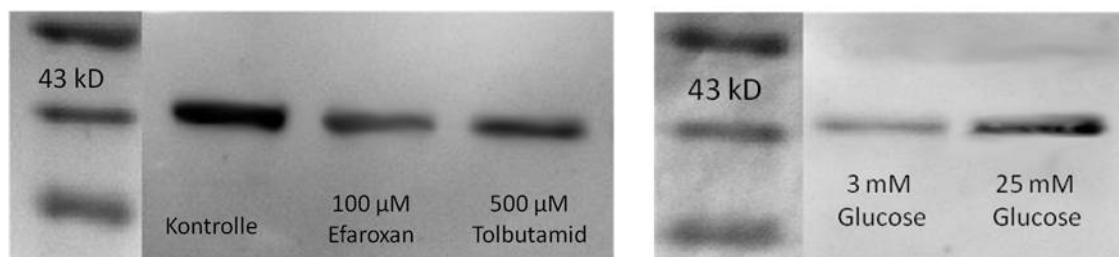
Ausgehend von dem Befund, dass bereits eine vierstündige Tolbutamid Exposition bereits zu einer Verminderung des Granulabestands führen kann, wurde versucht, die Degranulation im Laufe eines Umströmungsexperimentes von zwei Stunden darzustellen. Hierfür wurde der stärkste depolarisierende Stimulus, nämlich eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 40 mM gewählt. Dieser Stimulus sollte für 20 Minuten einwirken und die dadurch bedingte Degranulation sowie die sich anschließende Regranulation sollten an transient mit Insulin-EGFP transfizierten MIN6-Zellen beobachtet werden. Die transiente Transfektion wurde deshalb gewählt, weil hier die störenden extragranulären Präzipitate sehr viel weniger in Erscheinung traten (vgl. Kapitel 4.3.3) und dadurch die Notwendigkeit der Membranpermeabilisierung nicht gegeben war. Somit konnten Messungen an der gleichen Zelle zu mehreren Zeitpunkten durchgeführt werden. Unerwarteter Weise war zum Ende der Umströmung mit 40 mM KCl (Abb. 4.34, Zeitpunkt 40 Minuten) der Granulabestand nicht vermindert, sondern sogar leicht erhöht. Diese Erhöhung nahm zum Nachbeobachtungszeitpunkt (Abb. 4.34, Zeitpunkt 120 Minuten) sogar signifikante Ausmaße an. Anscheinend hat die Depolarisation auch ohne vorübergehende Verminderung des Granulabestandes zu einer Vermehrung der erkennbaren Granula geführt.



**Abb. 4.34 Wirkung einer KCl-Depolarisation auf den Granulationsstatus von transient transfizierten MIN6-Zellen.** Die Zellen wurden für 2 Stunden mit Krebs-Ringer-Medium umströmt, das 3 mM Glucose enthielt. Zwischen Minute 20 und 40 wurde die KCl-Konzentration auf 40 mM erhöht. Die Fluoreszenz der Sekretgranula wurde zu den Zeitpunkten 0 Minuten, 40 Minuten und 120 Minuten registriert. Die Auszählung der Granula ergab, dass zum Zeitpunkt 40 Minuten ein schwacher Zuwachs der Granulazahl eingetreten war, zum Zeitpunkt 120 Minuten war der Zuwachs signifikant ( $p < 0,05$ , zweiseitiger ungepaarter t-Test). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 6 Versuchen.

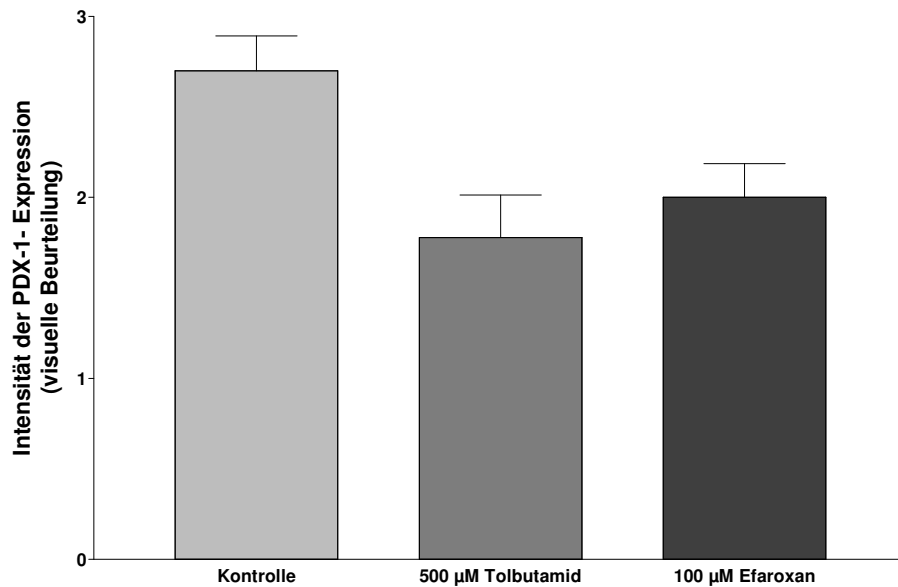
#### 4.7.6. Einfluss der Desensibilisierung auf die Expression von PDX-1

Es galt zu klären, ob die Reduktion des Granulabestandes durch Desensibilisierung mit  $K_{ATP}$ -Kanal-Blockern in einer verminderten Expression von Transkriptionsfaktoren, die die Insulinbiosynthese regulieren, begründet war. Zu diesem Zweck wurde die Expression des Transkriptionsfaktors PDX-1 in MIN6-Pseudoinseln, die für 20 Stunden in Anwesenheit von Efaroxan oder Tolbutamid kultiviert worden waren, mittels Western Blot bestimmt (Abb. 4.35).



**Abb. 4.35 Einfluss einer verlängerten Exposition mit Efaroxan und Tolbutamid auf die PDX-1-Expression in MIN6-Pseudoinseln.** MIN6-Pseudoinseln wurden mit DMEM mit 3 mM Glucose (Kontrolle) bzw. zusätzlich mit 100 µM Efaroxan oder 500 µM Tolbutamid für 20 Stunden kultiviert. Nach Desintegration der Membranen mittels Ultraschall wurden die löslichen Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und PDX-1 mit nicht-radioaktivem Western Blot nachgewiesen. Links: typischer Befund aus einer Reihe von 17 Versuchen. Die Intensität der Bande im Kontrollversuch beträgt ein Mehrfaches der Intensität der Banden nach Exposition mit Efaroxan oder Tolbutamid, wobei die Tolbutamid-Bande intensiver angefärbt ist als die Efaroxan-Bande. Rechts: Western Blot von MIN6-Pseudoinseln, die für 20 Stunden in DMEM mit 3 bzw. 25 mM Glucose kultiviert wurden. Die von Versuch zu Versuch stark schwankende Intensität der PDX-1-Bande wird im Vergleich zur Kontrollbande links klar erkennbar, ebenso wie die stärkere Intensität nach Kultur mit 25 mM Glucose. Dargestellt ist ein Einzelversuch.

Es zeigte sich, dass bei insgesamt 17 Versuchen sowohl Efaroxan als auch Tolbutamid die PDX-1 Expression in 12 Versuchen, im Vergleich zur Kontrolle, verminderten (Abb. 4.36), in 3 Versuchen war kein Unterschied in der Expression zu erkennen, und in zwei Versuchen der PDX-1-Gehalt in der Kontrolle höher. Der ungepaarte zweiseitige t-Test ergab, dass sowohl nach Efaroxan als auch nach Tolbutamid-Exposition die PDX-1-Expression signifikant verringert war. Nach der Korrektur für mehrfaches Testen blieb die Signifikanz für Tolbutamid bestehen, die für Efaroxan verlor jedoch an Aussagekraft.

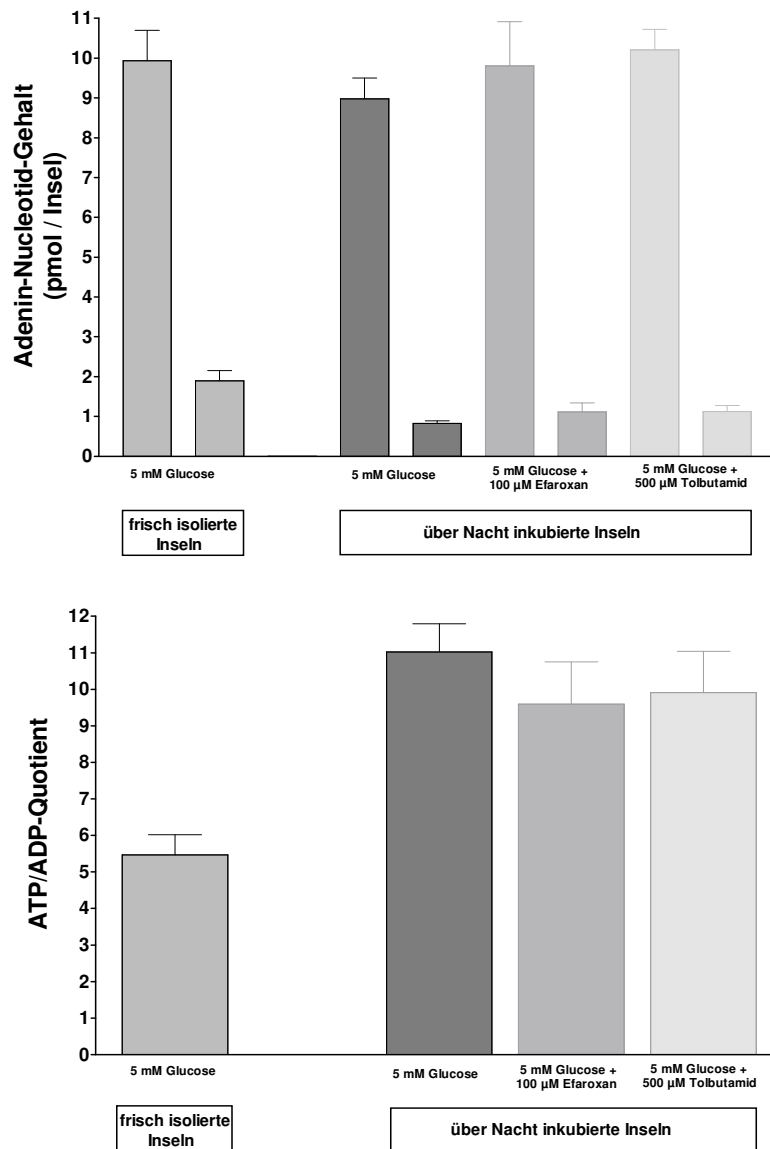


**Abb. 4.36 Quantifizierung der veränderten PDX-1-Expression in MIN6-Pseudoinseln nach einer verlängerten Exposition mit Efaroxan und Tolbutamid.** MIN6-Pseudoinseln wurden mit DMEM mit 3 mM Glucose (Kontrolle) bzw. zusätzlich mit 100 µM Efaroxan oder 500 µM Tolbutamid für 20 Stunden kultiviert. Nach Desintegration der Membranen mittels Ultraschall wurden die löslichen Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und PDX-1 mit nicht-radioaktivem Western Blot nachgewiesen. Dargestellt ist die semiquantitative Ermittlung der Intensitäten der PDX-1-Expression. Die Intensitäten wurden von zwei unabhängigen Beobachtern visuell ausgewertet und in 1er Schritten in eine Intensitäts-Skala von 0 bis 4 eingeteilt. Es zeigte sich, dass sowohl nach Tolbutamid- als auch nach Efaroxan-Exposition die PDX-1-Expression signifikant verringert war ( $p=0,0043$  für Tolbutamid vs. Kontrolle,  $p=0,0134$  für Efaroxan vs. Kontrolle, ungepaarter zweiseitiger t-Test). Nach der Korrektur für mehrfaches Testen blieb die Signifikanz für Tolbutamid bestehen ( $p=0,034$ ), die für Efaroxan wurde jedoch grenzwertig ( $p=0,071$ ).

#### 4.7.7. Einfluss der Desensitisierung auf den ATP- und ADP-Gehalt in Maus-Inseln

Sowohl der  $K_{ATP}$ -Kanal-abhängige Signalweg der Insulinsekretion als auch die funktionelle Ausreifung der Sekretgranula hängen von einem hinreichenden Angebot von ATP bzw. dem ATP/ADP-Quotienten ab (ELIASSON *et al.* 1997). Insofern kann die verminderte Sekretionsfähigkeit nach 20stündiger Exposition mit Efaroxan oder Tolbutamid auch durch eine Veränderung in den ATP- oder ADP-Gehalten der Pankreasinseln bedingt sein. Deshalb wurde der Gehalt an ATP und ADP in NMRI-Mausinseln, die genau wie für die Sekretionsmessungen desensitisiert worden waren, bestimmt. Es zeigte sich, dass der ATP-Gehalt nicht durch die Anwesenheit der  $K_{ATP}$ -Kanal-Blocker beeinflusst war, auch war der ATP-Gehalt der Kontrolle nicht signifikant gegenüber demjenigen von frisch isolierten Inseln verschieden. Allerdings

war der Gehalt an ADP signifikant gegenüber demjenigen von frisch isolierten Inseln vermindert. Es gab jedoch keinen Unterschied zwischen den ADP-Gehalten der kontroll-kultivierten und der desensitisierten Inseln (Abb. 4.37).



**Abb. 4.37 Einfluss einer verlängerten Exposition mit Efaroxan und Tolbutamid auf den Nucleotid-Gehalt von Maus-Inseln.** 15 NMRI-Maus Inseln wurden für 20 Stunden in RPMI1640-Medium bei substimulatorischer Glucosekonzentration (5 mM) kultiviert. Dem Medium waren 100 µM Efaroxan bzw. 500 µM Tolbutamid zugesetzt. Nach Extraktion wurde der Gehalt der Adenin-Nucleotide luminometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5-6 unabhängigen Versuchen. Die jeweils linke Säule der vier Säulenpaare zeigt den ATP-Gehalt pro Insel, die rechte den ADP-Gehalt. Links zum Vergleich der Nucleotidgehalt in frisch isolierten NMRI-Maus-Inseln. Die untere Darstellung zeigt die dazugehörigen ATP/ADP-Quotienten. Eine 20 stündige Exposition mit Efaroxan und Tolbutamid führte in NMRI-Maus Inseln zu keiner signifikanten Änderung des ATP/ADP-Quotienten im Vergleich zu kontroll-kultivierten Inseln. Diese zeigten aber im Vergleich zu frisch isolierten Inseln einen signifikant höheren ATP/ADP-Quotienten ( $p=0,0016$ , ungepaarter zweiseitiger t-Test).



## 5. Diskussion

### 5.1. Fluoreszenzmarkierung von Insulin-Sekretgranula- grundsätzliche Erwägungen

Die Fluoreszenzmarkierung der Insulin-Sekretgranula erschien aus mehreren Gründen als vielversprechender Ansatz, um die Mechanismen der Insulinsekretion, die bisher nur unvollständig verstanden sind, weiter aufzuklären. Es sollte damit möglich sein, die Zahl und Beweglichkeit der Sekretgranula vor und unmittelbar nach einem Stimulus zu beobachten, und ein Exozytoseereignis als solches darstellen zu können.

Bisher wurden die Insulingranula meistens mittels Elektronenmikroskopie dargestellt (RUSTENBECK 2002), (RUSTENBECK *et al.* 2004b), (YORDE und KALKHOFF 1987), (SCHNELL *et al.* 1988), da die  $\beta$ -Zellen oder Pankreasinseln jedoch für die Anfertigung der Aufnahmen fixiert werden müssen, ist eine dynamische Messung der Granulabewegung mit dieser Technik nicht möglich. Aufgrund des sauren pH-Werts in den Insulin-Sekretgranula sind auch Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. das Acridinorange oder Quinacrin verwendet worden, die in sauren Kompartimenten akkumulieren (OHEIM *et al.* 1998), (BOKVIST *et al.* 1995). Diese Markierung ist jedoch wenig selektiv. Prinzipiell muss bei der Wahl des Fluoreszenzlabels unterschieden werden, für welchen Einsatzzweck er verwendet werden soll. Für unsere Zwecke sollte ein Label einerseits die dynamische Messung des Granulationsstatus ermöglichen und andererseits die Exozytose erkennbar werden lassen.

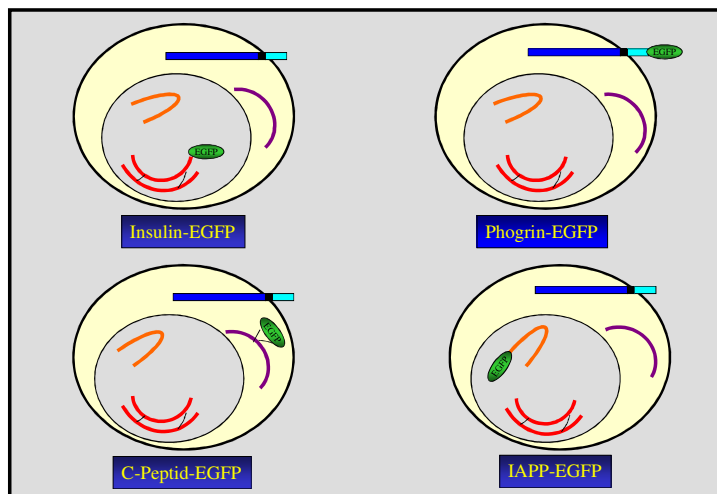
Messungen der Exozytose wurden bisher mittels elektrophysiologischer Kapazitätsmessungen durchgeführt. Hierbei ist es allerdings nicht möglich, eine Aussage darüber zu treffen, ob der Zunahme der Membrankapazität, die durch Oberflächenvergrößerung nach Verschmelzung der Plasmamembran mit der Granulamembran zustande kommt, auch tatsächlich die Freisetzung des Granulainhalts folgt. So gibt es eine intensive Diskussion, ob es in der  $\beta$ -Zelle sog. „kiss and run“-Ereignisse gibt, bei der es zur Bildung der Fusionspore, nicht jedoch zum Freisetzen des Granulainhalts kommt (TAKAHASHI *et al.* 2002), (RUTTER und HILL 2006; RUTTER und TSUBOI 2004), (MICHAEL *et al.* 2006), (MA *et al.* 2004).

Überdies werden Kapazitätsmessungen in der whole-cell-Konfiguration der Patch-Clamp-Technik durchgeführt. Da das Cytosol dabei durch die Pipettenlösung ausgewaschen wird, bleiben die Vorgänge der Stimulus-Sekretions-Kopplung in der untersuchten Zelle nicht unbeeinflusst.

Die Markierung der Insulin-Sekretgranula mit fluoreszierenden Fusionsproteinen eines endogenen Bestandteils des Granulums könnte potentiell für beide Zielsetzungen verwendbar sein. Neben den Veränderungen im Granulationsstatus sollte auch das Ereignis der Exozytose darstellbar sein.

## 5.2. Fluoreszierende Insulin-Fusionsproteine als Marker für Insulin-Sekretgranula

Für die Fluoreszenzmarkierung der Insulin-Sekretgranula standen zu Beginn der Arbeit prinzipiell zwei Lösungsansätze zur Diskussion. Neben dem Granulainhalt selbst war es auch möglich, die Vesikelmembran mit einem fluoreszierenden Protein zu versehen (Abb. 5.1).



**Abb. 5.1 Mögliche Ansätze der selektiven Fluoreszenzmarkierung der Insulin-Sekretgranula.** Oben links: Fusionsprotein aus Insulin und EGFP (diese Arbeit, (OHARA-IMAIZUMI et al. 2002a); oben rechts: Fusionsprotein aus Phogrin und EGFP (POULI et al. 1998a); unten links: Fusionsprotein aus C-Peptid und GFP (WATKINS et al. 2002); unten rechts: Fusionsprotein aus IAPP und EGFP (BARG et al. 2002b).

Prinzipiell ist die Fluoreszenzmarkierung des Granulainhalts der Markierung der Plasmamembran vorzuziehen, da dadurch die eigentliche Ausschüttung des Granulainhalts im Zuge der Exozytose beobachtet werden kann.

Es schien am geradlinigsten, das Insulin selbst als Cargo-Protein zu verwenden, und daher wurde dieses mit dem grün fluoreszierenden EGFP fusioniert. Erste Versuche zur Konstruktion und Expression eines solchen Insulin-Fusionsproteins durch die Gruppe um Rutter hatten jedoch zu einem „mistargeting“ des Konstrukts geführt

(POULI *et al.* 1998b). Ein anderes Fusionsprotein aus der membranständigen Phosphatase Phogrin mit EGFP führte zu einem deutlichen granulären Fluoreszenzmuster (POULI *et al.* 1998a), so dass dieses Fusionsprotein in weiteren Arbeiten der Gruppe um Rutter dafür verwendet wurde, die Insulin-Sekretgranula selektiv darzustellen (RUTTER 2004).

Die Arbeitsgruppe um Nagamatsu beschrieb 2002 ein Insulin-EGFP-Fusionsprotein, mit dem es möglich war, die Granulation zu quantifizieren, die Exozytose selbst zu beobachten und darüber hinaus einen Unterschied zwischen depolarisations-induzierter und nährstoffinduzierter Freisetzung zu dokumentieren (OHARA-IMAIZUMI *et al.* 2002a). Damit schien dieses Konstrukt ideal geeignet für die oben definierte Aufgabenstellung. Allerdings war das Konstrukt in dieser Publikation insofern unvollständig beschrieben, als die durch den Vektor definierte Sequenz zwischen Insulin und EGFP nicht angegeben war, und auch von den Autoren direkt nicht zu erfahren war. Daher bestand die Notwendigkeit, selbst nach dem „trial and error“-Prinzip zu einem fluoreszierenden Konstrukt zu gelangen. Diese Aufgabe war insofern nicht trivial, als die Aminosäure-Sequenz der Linker-Region einen entscheidenden Einfluss auf die Fluoreszenz-Eigenschaften des Fusionsproteins hat (MICHAEL *et al.* 2004). Dadurch wird nicht nur die Fluoreszenzintensität beeinflusst, sondern auch die Reaktion des Labels bei der Exozytose. So hat die Gruppe um Chow gezeigt, dass bei prinzipiell gleichen Konstrukten das Reaktionsmuster der Fluoreszenz bei Freisetzung in Abhängigkeit von der Linker-Region variiert (MICHAEL *et al.* 2004). Später stellte sich heraus, dass das in dieser Arbeit hergestellte Konstrukt bis auf die N-terminale erste Aminosäure in der Linker-Region mit dem Konstrukt der Gruppe um Nagamatsu (OHARA-IMAIZUMI *et al.* 2004) identisch war: statt eines Tryptophan-Rests enthielt das in dieser Arbeit verwendete Konstrukt einen Glycin-Rest.

Die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen nach transienter Transfektion des Konstrukts in insulinsezernierenden Zellen deckten sich mit den veröffentlichten Daten der Nagamatsu-Gruppe insofern, als sich 1 - 2 Tage nach Transfektion eine anscheinend rein intragranuläre Lokalisation des fluoreszierenden Materials beobachten ließ. Ein „mistargeting“, wie es die Gruppe um Rutter beschrieben hatte, trat unter Verwendung des eigenen Insulin-Labels nicht auf. Erhebliche Diskrepanzen mit den Befunden der Nagamatsu Gruppe gab es allerdings bei der Analyse des Freisetzungsverhaltens des Fusionsproteins. Es

ließen sich drei unterschiedliche Reaktionsmuster der Fluoreszenz darstellen: 1) eine dauerhafte Intensivierung der Fluoreszenz eines einzelnen Granulums, 2) eine starke Verminderung der Fluoreszenz und 3) eine vorübergehende Intensivierung. Dabei war die vorübergehende Aufhellung vor Erlöschen zwar dominant, aber nicht alleinig vorhanden. Die Nagamatsu-Gruppe beschrieb dieses Muster aber als ausschließlich vorhanden und bezieht die Quantifizierung der Exozytose auf dieses Merkmal (OHARA-IMAIZUMI *et al.* 2002a; OHARA-IMAIZUMI *et al.* 2002b; OHARA-IMAIZUMI *et al.* 2004). Das Auftreten unterschiedlicher Muster bei einunddemselben Label wurde von der Gruppe um Chow auch für andere Konstrukte beobachtet (MICHAEL *et al.* 2004). Eine praktisch homogene Reaktion brachte nach den Daten dieser Gruppe nur die Verwendung eines rIAPP-Fusionsproteins, das zu einem dauerhaften Ansteigen der Fluoreszenz führt. Für die Quantifizierung der Exozytose ist ein homogenes Reaktionsmuster vorzuziehen, es kommt aber darauf an, was detektiert werden soll. Bei einem homogenen dauerhaften Aufleuchten der Fluoreszenz eines Granulums ist die Exozytoseaktivität als treppenförmige Summation der Fluoreszenzintensitäten leicht darstellbar (analog zur Zunahme der Kapazität in der elektrophysiologischen Technik (NEHER und MARTY 1982), (NEHER 1998)), es wird aber die Beobachtung der noch freisetzbaren Granula in Membrannähe erschwert. Es lässt sich insgesamt aus diesen Beobachtungen schlussfolgern, dass kein Label universell einsetzbar ist. Das von uns verwendete Insulin-EGFP-Fusionsprotein kann zur dynamischen Messung der Granulation und Zahl der membrannahen Granula mittels TIRFM als gut geeignet bezeichnet werden, weniger gut jedoch zum Quantifizieren der Exozytose selber.

Für weiterführende Untersuchungen, beispielsweise Co-Lokalisations-Versuche, sollte ein zweiter Label konstruiert werden, der u.a. Lokalisationsstudien mit EGFP-markierten zellulären Proteinen ermöglichen sollte. Darüberhinaus sollte die simultane Messung mit herkömmlichen fluoreszierenden Calciumindikatoren möglich werden und dieser Label ein geeigneter FRET-Partner für EGFP (YANG *et al.* 2005) sein.

Auf der Suche nach einem geeigneten fluoreszierenden Protein bot sich das von der Arbeitsgruppe Tsien entwickelte rot fluoreszierende Tandem-Dimer tdimer2(12) an. Dieses Protein war deshalb interessant, weil es im Gegensatz zu DsRed eine hohe Fluoreszenzintensität bei einer geringen Rate an Photobleaching zeigte (CAMPBELL *et al.* 2002). Zudem reift DsRed nur langsam und zum Teil auch nur

unvollständig aus, und neigt zur Aggregation, so dass es im ausgereiften Zustand als großvolumiges Tetramer vorliegt (BAIRD et al. 2000). Das tdimer ist deutlich kleiner, und daher war anzunehmen, dass die Zellphysiologie weniger beeinflusst wird und damit auch die korrekte Verpackung des Insulins in die Sekretgranula wahrscheinlicher wird.

Ausgehend vom bereits vorhandenen Insulin-EGFP wurde das Insulin-tdimer synthetisiert. Die Expression in insulinproduzierende Zelllinien ergab dem Insulin-EGFP vergleichbare Eigenschaften, insofern als ein granuläres Fluoreszenzmuster sichtbar wurde, das nach Permeabilisierung der Plasmamembran stabil blieb. Der Nachweis einer Reaktion auf einen Exozytosestimulus war zunächst nicht möglich, da in der kooperierenden Arbeitsgruppe von Prof. Chow, die die TIRF-mikroskopischen Aufnahmen durchführten, kein geeigneter Laser zur Verfügung stand. Im Laufe der weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass das Insulin-tdimer dem Insulin-EGFP-Fusionsprotein in vielerlei Hinsicht überlegen war. Wichtiges Kriterium hierfür war die Tatsache, dass sowohl MIN6-Zellen als auch einzelne  $\beta$ -Zellen und NMRI-Maus-Inseln eine ausgeprägte granuläre Autofluoreszenz aufwiesen. Diese hatte einen Emissionsbereich, in dem auch die EGFP-Fluoreszenz detektiert wurde. Das führte zu Problemen bei der Quantifizierung des Granulabestands. Die maximale Emissionswellenlänge des tdimer liegt ausreichend weit von der Autofluoreszenz entfernt, so dass eine Abtrennung der Autofluoreszenz problemlos möglich war. Auch zeigte das tdimer eine höhere Fluoreszenzintensität als das EGFP, es sollte jedoch im direkten Vergleich weniger photostabil sein (SHANER et al. 2005). Diese beschriebene Eigenschaft wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht auffällig.

Um eine dauerhafte Expression des Fusionsproteins in einer Vielzahl von MIN6-Zellen zu erreichen, wurden mit beiden Labeln stabil transfizierte Zellklone hergestellt. Bei Betrachtung der Zellklone mittels Epifluoreszenz fiel ein deutlicher Unterschied im Granulationsmuster zwischen transient und stabil transfizierten Zellen auf. Neben den von transients Transfektion bekannten feingranulären Strukturen fanden sich auch Granula mit atypisch großem Durchmesser. Der größte Teil der selektierten Klone zeigte allerdings keine Fluoreszenz trotz ständigen Wachstums unter Selektionsdruck. Diejenigen Klone die fluoreszierten, glichen sich im Granulationsmuster, d. h. neben feingranulären Strukturen fanden sich immer grobe

fluoreszierende Aggregationen, wie sie auch nach längerdauernder transienter Transfektion zu beobachten war. Die Auswaschbarkeit des fluoreszierenden Materials nach Permeabilisierung deutete darauf hin, dass diese Aggregate nicht membranumgeben sind sondern extragranulär im Cytosol vorliegen.

Für die Anwendbarkeit der stabil transfizierten Zellklone ergab sich dadurch die Beschränkung, dass Beobachtungen der Exozytose oder dynamische Messung im Zuge der Desensitisierung der Insulinsekretion in der intakten Zelle nicht mehr möglich waren. Für diese Art der Untersuchungen war ein Ausweichen auf die aufwändigere transiente Transfektionsmethode erforderlich. Untersuchungen zum Granulabestand als solchen konnten aber nach Permeabilisierung und Auswaschen der Aggregate und anschließender Zählung der eigentlichen Granula durchgeführt werden. Da in den Zellen nach der Permeabilisierung die physiologischen Regulationsmechanismen zerstört sind, handelt es sich bei dieser Art der Untersuchungen um Endpunktmessungen. Der Vorteil stabil transfizierter Zellklone lag darin, dass nahezu alle Zellen im Präparat das fluoreszierende Fusionsprotein exprimierten, im Vergleich zur transienten Transfektion, bei der die Effizienz bei nur ca. 40 - 60% lag. Für solche Untersuchungen, bei denen viele Zellen ausgezählt werden mussten, empfahl sich also weiterhin die Verwendung stabil transfizierter Zellklone.

Neben den extragranulären Depots von Insulin-EGFP wurde die Auswertung noch durch ein weiteres Phänomen beeinträchtigt, die Entstehung einer intensiven Fluoreszenz in einem halbmondförmigen Gebiet in der Nähe des Zellkerns. Die Versuche, dieses Phänomen aufzuklären, führten zur Erkenntnis, dass dieses Gebiet eine hohe Mitochondriendichte aufweist. Es handelte sich jedoch nicht um eine mitochondriale Autofluoreszenz, da gezeigt werden konnte, dass die so entstandene fluoreszierende Zone auswaschbar war. Da dieses Phänomen mit beiden Labeln, nicht aber mit nicht-transfizierten Zellen zu beobachten war, ist also davon auszugehen, dass das normalerweise granulär gespeicherte Insulin-EGFP-Fusionsprotein freigesetzt worden war. Da ferner zu beobachten war, dass dieses Phänomen von der Belichtungsdauer der Fluoreszenzanregung, nicht aber von der Versuchsdauer abhängig war, ergab sich als Hypothese, dass es sich um eine toxische Konsequenz der Belichtung handelte, evtl. vermittelt durch mitochondriale Bildung und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies. Schließlich lässt sich auch

die Beobachtung, dass sich dieser Prozess auch durch Depolarisation (durch Kalium oder Tolbutamid) deutlich verstärken ließ, mit dieser Hypothese vereinbaren, da der begleitende Calciumeinstrom zu einer vermehrten Beladung der Mitochondrien mit Calcium führt, und damit die mitochondriale „permeability transition“ leichter stattfinden kann (BERNARDI und FORTE 2007).

Die Generierung eines dritten Fusionsproteins sollte Auskünfte über das Alter der Insulin-Sekretgranula ermöglichen. Dadurch sollten weitere Einsichten in die Regulation der Insulinsekretion gewonnen werden, und auch die Mechanismen der Desensibilisierung weiter aufgeklärt werden. Bei dem hierfür verwendeten fluoreszierenden timer-Protein handelt es sich um eine Mutante des rot fluoreszierenden Proteins DsRed (MATZ et al. 1999), bei der zwei Aminosäuren des Ursprungsproteins ausgetauscht wurden (TERSKIKH et al. 2000). Dadurch veränderten sich die spektralen Eigenschaften des Proteins dahingehend, dass die Fluoreszenz intensiver wird, und sie sich mit zunehmender Expressionsdauer vom grünen (fünf bis sechs Stunden nach Expressionsbeginn) in den roten (mehr als neun Stunden nach Expressionsbeginn) Emissionsbereich verschiebt. Neu synthetisiertes Protein erscheint demnach grün, ausgereiftes Protein rot, wobei auch Zwischenstufen von gelber und oranger Fluoreszenz beobachtet worden sind (TERSKIKH et al. 2000).

Die Anwendbarkeit des timer-Proteins zur Beobachtung der Exozytose in chromaffinen Zellen wurde von der Gruppe um Chow beschrieben (DUNCAN et al. 2003), (WIEGAND et al. 2003). Das Protein war in diesem Fall fusioniert mit dem atrial natriuretic factor (ANF). Mittels zweifarbigem Laser-TIRFM konnten zwei verschiedene Granula Pools unterschiedlichen Alters dargestellt werden. Die neu synthetisierten grünen Granula waren unbeweglich an der Plasmamembran lokalisiert, die älteren roten waren beweglich und befanden sich im Inneren der Zelle. Die Stimulation mit Nicotin, die einem physiologischen Stimulus entspricht, bewirkte die Ausschüttung der Granula des sogenannten RRP an der Plasmamembran,  $Ba^{2+}$  hingegen bewirkte die Mobilisierung der älteren Granula aus tieferen Zellbereichen. Es wurde demnach geschlussfolgert, dass die jüngeren Granula vor den älteren freigesetzt werden. Letztere werden erst durch einen massiven Stimulus zur Ausschüttung gebracht. Da es sich bei den Granula von chromaffinen Zellen ebenso wie bei den Insulin-Sekretgranula um sogenannte

„large dense core vesicles“ (LDCVs) handelt, und deren Exozytose-Regulation mit der von Insulin-Sekretgranula vergleichbar ist, sollte das Insulin-timer-Fusionsprotein als Werkzeug bei der Charakterisierung der Mechanismen der Insulinsekretion hilfreich sein.

Tatsächlich ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, mit einem Fusionsprotein aus Insulin und dem timer-Protein zwei Populationen an Sekretgranula unterschiedlichen Alters darzustellen. Dabei überwog nach transienter Transfektion die Anzahl der grün fluoreszierenden Granula die der rot fluoreszierenden. Zudem fand sich eine geringe Anzahl von gelblich-orange fluoreszierenden Granula. Allerdings war eine deutliche Hintergrundfluoreszenz zu beobachten, die ausgeprägter war als bei den anderen verwendeten Insulin-Fusionsproteinen. Der Grund dafür liegt möglicherweise in der räumlichen Struktur des timer-Proteins. Ausgereift liegt es als Tetramer vor (VERKHUSHA und LUKYANOV 2004), im Gegensatz zum EGFP oder dem tdimer, die jeweils als Dimere vorliegen (SHANER *et al.* 2005). Man könnte annehmen, dass die Größe des Proteins die Verpackung in die Sekretgranula behindert, und das exprimierte Fusionsprotein dadurch vermehrt cytosolisch vorliegt. Die beobachtete Hintergrundfluoreszenz stellte sich je nach Expressionssdauer auch grün, orange oder gelb dar. Ob sich die mit Insulin-timer transfizierten Zellen in ihren Charakteristika den Insulin-EGFP bzw. den Insulin-tdimer transfizierten Zellen entsprechen bleibt zu klären.

### **5.3. Vektorsysteme zum effektiven Transfer von Fremd-DNA in Säugerzellen - ein Vergleich**

Gegenwärtig besteht nur mittels viraler Infektion die Möglichkeit, primäre sich nicht teilende Zellen zu transfizieren. Da die Glucoseabhängigkeit der depolarisationsinduzierten Insulinsekretion in MIN6-Zellen deutlich geringer ist als die von normalen NMRI-Maus-Inseln, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist die virale Transfektion von normalen  $\beta$ -Zellen oder ganzen Inseln wünschenswert.

Herkömmliche Methoden, die an Zelllinien eine hinreichende Effizienz haben wie z.B. die Calciumphosphat-Präzipitation und monokationische oder polykationische Liposomen-basierte Transfektionssysteme, erwiesen sich an intakten Inseln als nicht effizient (SALDEEN *et al.* 1996). Dispersion in Einzelzellen erhöht die Transfektionseffizienz deutlich (SALDEEN *et al.* 1996), bedingt aber, dass die

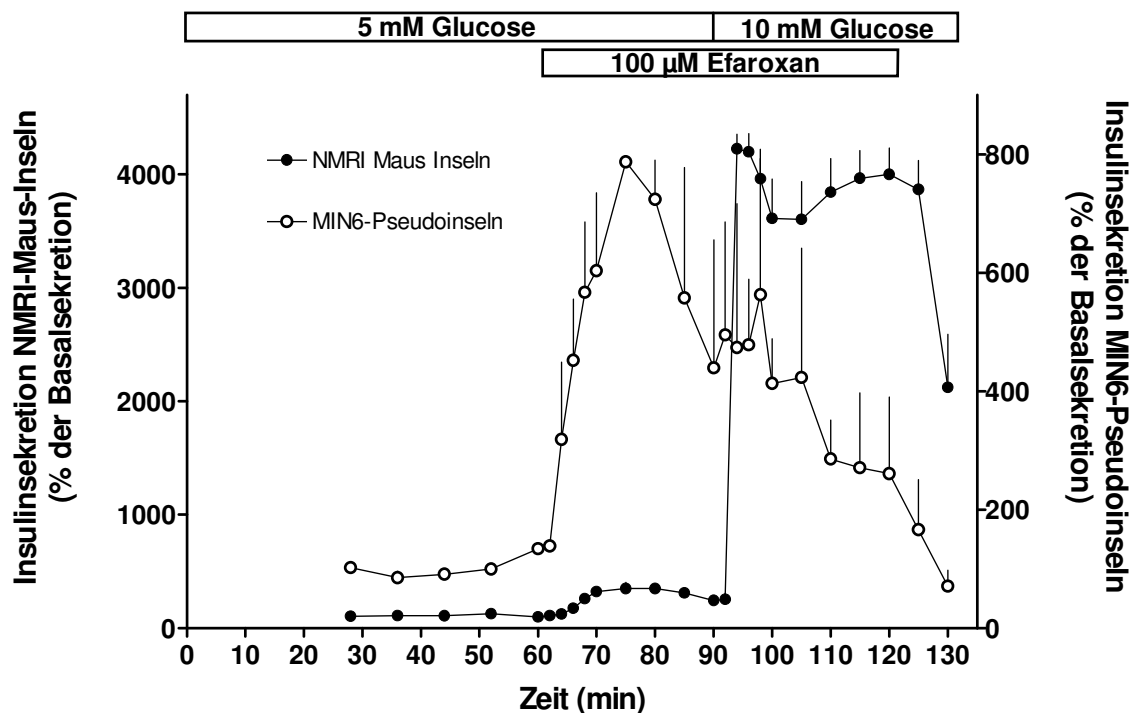


Einzelzellen nachher wieder reaggregieren müssen, um ein inseltypisches Sekretionsverhalten zu zeigen (CALLEWAERT et al. 2007).

Adenovirale Transfektionssysteme werden am häufigsten für *in vitro* Transfektionen verwendet und sind seit längerem kommerziell erhältlich. Adenoviren übertragen die DNA episomal, d.h. die Transgenexpression ist nur transienter Art. Isolierte Pankreas-Inseln zeigen nach adenoviraler Transfektion eines Transgens mit niedrigem Virus-Titer keine signifikante Zunahme der Apoptose und keine Veränderungen der Glucose-induzierten Insulinsekretion (WEBER et al. 1997). Für eine optimale Expression des Transgens sind allerdings häufig hohe Konzentrationen an Viren erforderlich. Dabei kommt es in den meisten Fällen zum Untergang der  $\beta$ -Zellen (WEBER et al. 1997). Lentiviren integrieren den Nucleinsäureabschnitt direkt ins Genom, so dass die Transgen-Expression über einen langen Zeitraum erhalten bleibt (LEWIS et al. 1992), (VERMA und SOMIA 1997). Der hier verwendete lentivirale Vektor ist abgeleitet von dem von der Gruppe um Trono vorgestellten und weiterentwickelten System (DULL et al. 1998; ZUFFEREY et al. 1998). Er ist formal als ein Übergang von der zweiten zur dritten Generation dieses Systems aufzufassen. Die Transfektionseffizienz an primären  $\beta$ -Zellen der Maus reichte nach unseren Erfahrungen an 100% ran. Die Prüfung der Funktion von  $K_{ATP}$ -Kanälen und der Regulation des cytosolischen Calciums ergab keinen Hinweis auf Störungen der Signaltransduktion in den transfizierten Zellen (s. Kapitel 4.2). Prinzipiell können auch mit einem lentiviralen System cytotoxische Effekte hervorgerufen werden. Es bestand aber angesichts der praktisch vollständigen Transfektion der Zellen keine Notwendigkeit zur Verwendung höherer Titer. Ähnlich wie bei stabil transfizierten insulinproduzierenden Zellen, oder wie bei transient transfizierten Zellen, bei denen der Transfektionszeitpunkt länger als drei Tage zurücklag, waren auch mit viral infizierten  $\beta$ -Zellen granuläre fluoreszierende Aggregate im Cytoplasma erkennbar, wobei diese Aggregate noch größer waren als diejenigen in stabil transfizierten Zellen (s. Kapitel 4.2, Abb. 4.9). Insofern sind auch der Verwendungsfähigkeit dieses Transfektionssystems Schranken gesetzt. Ansonsten ist anzunehmen, dass wegen der hohen Transfektionseffizienz und der geringen Cytotoxizität das lentivirale System den von den anderen Gruppen (OHARA-IMAIZUMI et al. 2004), (WATKINS et al. 2002), (MICHAEL et al. 2004) verwendeten adenoviralen Systemen überlegen ist.

#### **5.4. Charakteristika der Insulin- und C-Peptidsekretion von transfizierten MIN6-Zellen**

Die Fluoreszenzmarkierung der Sekretgranula ist im Wesentlichen deshalb notwendig, weil durch die amplifizierenden Signale (HENQUIN 2000), (BRATANOVA-TOCHKOVA *et al.* 2002) Dissoziation zwischen dem leicht zu verfolgendem Calciumsignal und der Sekretionsrate auftreten. Insofern ist eine solche Markierung letztlich nur in solchen Zellen lohnend, bei denen die Stimulus-Sekretions-Kopplung den Verhältnissen in den primären  $\beta$ -Zellen oder genauer den  $\beta$ -Zellen innerhalb der Pankreasinsel entspricht. Eine konkrete Anwendung die vorgesehen war, ist die weitere Aufklärung der ausgeprägten Glucoseabhängigkeit der Imidazolin-induzierten Insulinsekretion (RUSTENBECK *et al.* 2004b), (BLECK *et al.* 2004), (CHAN *et al.* 1991). Deshalb muss mit besonderer Sorgfalt darauf geachtet werden, dass das Sekretionsverhalten der leicht zu transfizierenden insulinproduzierende Zelllinie unter den konkret gegebenen Bedingungen denjenigen von Pankreasinseln entspricht. Deshalb wurden die kinetischen Sekretionsdaten von umströmten Inseln bzw. MIN6-Pseudoinseln, die verglichen mit der gleichen Anzahl an einzeln wachsender MIN6-Zellen ein deutlich gesteigertes Sekretionsverhalten zeigen (LUTHER *et al.* 2006), in der folgenden Graphik miteinander verglichen. Es wird deutlich, dass die dem Efaroxan eigentümliche starke Glucoseabhängigkeit der Sekretionssteigerung nur mit den Pankreasinseln, nicht aber mit den MIN6-Pseudoinseln zu beobachten ist (Abb. 5.2).



**Abb. 5.2 Insulinsekretion von umströmten MIN6-Pseudoiseln und NMRI-Maus-Iseln.** 50 MIN6-Pseudoiseln wurden unter gleichen Bedingungen wie 50 frisch isolierte NMRI Pankreasinseln umströmt, d. h., zunächst mit Krebs-Ringer Medium mit 5 mM Glucose. Ab Minute 60 war 100  $\mu$ M Efaroxan anwesend und in fortdauernder Anwesenheit von Efaroxan wurde die Glucose bei Minute 90 auf 10 mM erhöht. Von Minute 120 bis zum Versuchsende wurde die Stimulation nur mit 10 mM Glucose durchgeführt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von 4-5 unabhängigen Versuchen. Die Insulinsekretion der NMRI-Maus-Iseln ist auf der linken Skala angegeben, die der MIN6-Pseudoiseln auf der rechten.

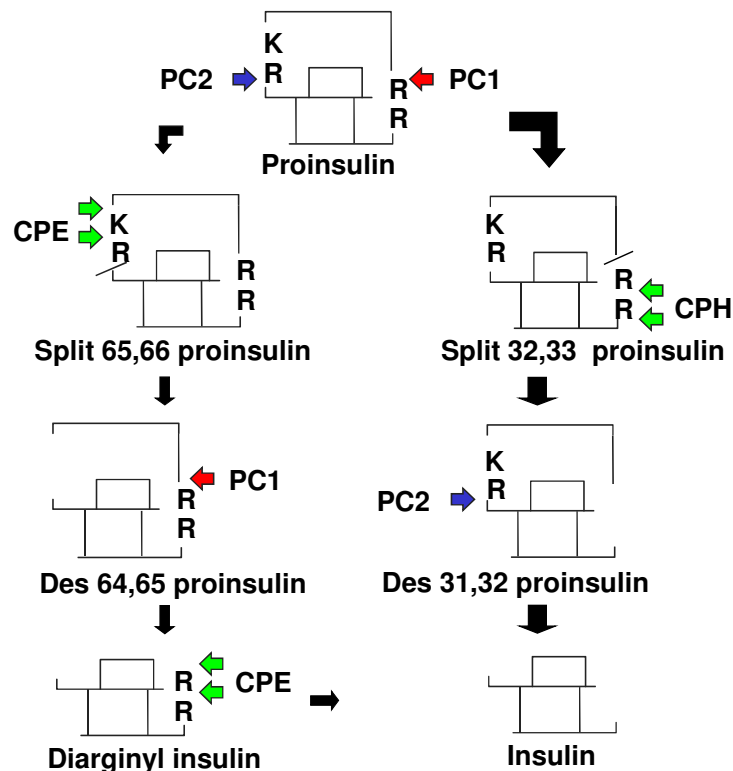
Das unterstreicht die Notwendigkeit, Transfektionssysteme zu entwickeln, mit denen primäre  $\beta$ -Zellen transfiziert werden können. Ein lentiviraler Vektor, mit dem zumindest einzelne  $\beta$ -Zellen erfolgreich transfiziert werden können, ist im Rahmen dieser Arbeit entstanden (s. Kapitel 4.2 und 5.3). Es wird Aufgabe zukünftiger Arbeiten sein, Protokolle zu entwickeln, mit deren Hilfe ganze Inseln transfiziert werden können (GIANNOUKAKIS et al. 1999), (HE et al. 2006).

In einer mehr detailorientierten Ebene stellt sich die Frage, wie weit die Exozytose der Insulin-EGFP Granula als repräsentativ für die Exozytose sämtlicher insulinhaltiger Granula betrachten werden kann. Hier sind auf Seiten der Fluoreszenztechniken deutlich mehr Versuche zur Charakterisierung des Systems notwendig als auf Seiten der Kapazitätsmessungen. Das hier verfolgte Verfahren, ein C-terminal fusioniertes Insulin-EGFP herzustellen eröffnete die Möglichkeit, dessen

Freisetzung durch Messung des C-Peptid-Spiegels mit einer unabhängigen Methode zu prüfen. Dies setzt jedoch die vollständige Prozessierung des Fusionsproteins in den Sekretgranula voraus. In der Literatur waren jedoch über die Prozessierung von Insulin-Fusionsproteinen, insbesondere Insulin-EGFP, keine Angaben enthalten (OHARA-IMAIZUMI *et al.* 2002a; OHARA-IMAIZUMI *et al.* 2002b; OHARA-IMAIZUMI *et al.* 2004).

Aufgrund der immunohistochemischen Untersuchungen an transfizierten MIN6-Zellen (diese Arbeit, s. Kapitel 4.1.4) war allerdings anzunehmen, dass es zu einer vollständigen Prozessierung des Insulin-EGFPs kommen müsste. Daher war die Beobachtung, dass nur sehr geringe C-Peptid Mengen in den Umströmungsversuchen und in den statischen Inkubationen nachweisbar waren, überraschend. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist, dass es nur zu einer unvollständigen Spaltung des Insulin-Moleküls kommt (Abb. 5.3), und das dadurch entstehende Peptid mit dem Antikörper im C-Peptid-ELISA nicht reagiert. Obwohl auch dieser Antikörper eine gewisse Kreuzreaktivität aufweist, wäre eine deutliche verminderte Reagibilität anzunehmen, da das vergleichsweise große EGFP noch am entstandenen Peptid gebunden ist. Die Diskrepanz zur Immunohistochemie, die einen deutlichen Nachweis von C-Peptid in den transfizierten Zellen erbracht hatte (s. Kapitel 4.1.4) lässt sich am ehesten mit einer geringeren Spezifität des dort verwendeten Antikörpers erklären.

Das mit dem humanen C-Peptid-ELISA gemessene Signal ist wahrscheinlich als Summe mehrerer Kreuzreaktivitäten aufzufassen. Auf diese Weise wird der mengenmäßig gleiche Nachweis von humanem C-Peptid in transfizierten und nicht-transfizierten MIN6-Zellen verständlich. Auch die Tatsache, dass in lysierten transfizierten Zellen nicht mehr C-Peptid nachweisbar war als in nicht transfizierten (Abb. 4.27) spricht dafür, dass nicht die Exozytose des Fusionsproteins behindert ist, sondern dass das Fusionsprotein unvollständig gespalten wird (Abb. 5.3) und der C-Peptid-Antikörper das unvollständig prozessierte Insulin nicht erkennt.



BDC -Hutton

**Abb. 5.3 Zwei Umbauwege vom Proinsulin zum Insulin.** Der erste Weg (rechts) beginnt mit der Spaltung der Aminosäurekette durch die Prohormon-Convertase 1 (PC1). Dann werden durch die Carboxy-Peptidase H (CPH) zwei Arginin-Reste an Position 31 und 32 abgespalten. Schließlich spaltet PC2 das Des 31,32 Poinulin zwischen Lysin und Arginin zum Insulinmolekül. Neben dem beschriebenen ersten Weg existiert noch ein weiterer Weg der Proinsulinprozessierung (links). Die Enzyme spalten hier die Aminosäurekette an anderen Positionen. Für die endgültige Insulin-Bildung ist ein zusätzlicher Spalt-Schritt einer CP erforderlich. Die in dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteine werden vermutlich nicht korrekt prozessiert und können nicht an die verwendeten Antikörper binden. Sowohl der C-Peptid- als auch der Insulin-Antikörper zeigen eine Kreuzreaktivität für die verschiedenen Spaltprodukte, die während der Insulinprozessierung auftreten. Abbildung adaptiert von J. HUTTON, *Advances in experimental medicine and biology* 552, 39-65, 2004.

Ist also die transfizierte MIN6-Zelle als Modell gänzlich unbrauchbar? Diese Vermutung ist in der allgemeinen Form nicht zutreffend, da das Reaktionsmuster der Sekretion dem der nicht transfizierten Kontrollzellen entspricht. Insofern sind die transfizierten MIN6-Zellen brauchbar für vesicle tracking und möglicherweise Exozytosemessungen. Wie für MIN6-Zellen allgemein gilt, dass depolarisierende Stimuli hocheffektiv wirken, die Reaktion auf Nährstoffstimuli verglichen mit intakten Inseln jedoch deutlich vermindert ist. Auch aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Notwendigkeit, die Granulation und Exozytose an  $\beta$ -Zellen und intakten Inseln zu untersuchen, wobei gegenwärtig nur eine virale Infektion zur Expression der fluoreszierenden Insulin-Fusionsproteine führen kann.

### 5.5. Mechanismen der Desensitisierung der Insulinsekretion

Das längerfristige Einwirken eines insulinsekretorischen Stimulus mit depolarisierendem Charakter oder auch mit zusätzlichem Nährstoffcharakter führt regelmäßig zu einer Abnahme der sekretorischen Antwort (RUSTENBECK 2002; RUSTENBECK *et al.* 2004b). In Arbeiten der Gruppe um Morgan ist die Desensitisierung der Insulinsekretion durch Imidazoline als spezifisch beschrieben worden, d.h. sie sollte nicht hemmend auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion wirken. Sie wurde daher als Hinweis auf die Existenz von spezifischen Imidazolin-Rezeptoren interpretiert (CHAN *et al.* 1993). Bei einer genaueren Untersuchung stellte sich jedoch heraus, dass die Desensitisierung der Insulinsekretion durch depolarisierende Stimuli, zu denen auch die Imidazoline gehören (PLANT und HENQUIN 1990), nicht als homologe Desensitisierung durch rezeptornahen Mechanismen aufgefasst werden kann, sondern ganz wesentlich durch distale Effekte in der Stimulus-Sekretions-Kaskade bestimmt wird, d.h. im Wesentlichen eine heterologe Desensitisierung darstellt (RUSTENBECK *et al.* 2001a; RUSTENBECK *et al.* 2001b). Wenn schnell reversible depolarisierende Stimuli verwendet wurden wie Tolbutamid oder Efaroxan, so zeigte sich, dass die Stimulus-Sekretions-Kopplung mittels des  $K_{ATP}$ -abhängigen Signalwegs zumindest bis zur Regulation der cytosolischen Calciumkonzentration intakt blieb (RUSTENBECK *et al.* 2001a; RUSTENBECK *et al.* 2004a).

Andererseits zeigten sich die  $\beta$ -Zellen in solchen desensitisierten Inseln deutlich degranuliert (RUSTENBECK *et al.* 2001a; RUSTENBECK *et al.* 2001b). Die Hypothese, dass der Granulationsstatus von entscheidender Bedeutung für die verminderte sekretorische Responsivität sein könnte, wurde durch den Befund gestützt, dass bereits nach vier Stunden Erholungszeitraum eine deutlich gesteigerte z. T. überschießend gesteigerte Sekretion zu erkennen war (RUSTENBECK *et al.* 2004a). Insofern hat zwar nicht der globale Insulingehalt oder die Gesamtmenge der Granula, aber doch die Regulation der Granulopoese eindeutige Beziehung zur sekretorischen Responsivität. Im Rahmen dieser Arbeit war zu prüfen, ob diese Schlussfolgerung, die auf Versuchen mit dem Imidazolin Efaroxan beruht, allgemein gültig für  $K_{ATP}$ -Kanal blockierende Pharmaka ist. Deshalb wurde Tolbutamid in einer Konzentration von 500  $\mu$ M verwendet, eine Konzentration, die ähnlich stark hemmend auf den  $K_{ATP}$ -Kanal wirkt wie 100  $\mu$ M Efaroxan (BLECK *et al.* 2005). 20 Stunden Tolbutamid-Exposition reduzierte die Sekretion bei erneuter Stimulation

auf ca. 50%, bezogen auf die Tolbutamid-induzierte Sekretion von kontroll-kultivierten Inseln. Diese Reduktion entspricht größenordnungsmäßig der Efaroxan Desensitisierung (RUSTENBECK *et al.* 2004b). Verglichen mit Efaroxan war aber bemerkenswert, dass die Glucoseabhängigkeit der Sekretion bei kontroll-kultivierten Inseln wesentlich geringer ausfiel und bei Tolbutamid-desensitisierten Inseln praktisch aufgehoben war. Ob hierfür die diskutierten distalen Effekte von Sulfonylharnstoffen und Imidazolinen wesentlich (TIAN *et al.* 1998) oder die unterschiedliche Art der Hemmung des  $K_{ATP}$ -Kanals (GROSSE-LACKMANN *et al.* 2003), (WIENBERGEN *et al.* 2007) entscheidend ist, ist derzeit noch unklar. Bemerkenswertester Befund war jedoch die deutlich unterschiedliche Erholung von der Desensitisierung. Während Tolbutamid-desensitisierte Inseln nach vier Stunden eine nur mäßig gesteigerte Sekretion zeigten, zeigten Efaroxan-desensitisierte Inseln nach vier Stunden eine praktisch vollständig wiederhergestellte Efaroxan-induzierte Sekretion in Gegenwart von 10 mM Glucose und sogar eine überschießende sekretorische Antwort bei 5 mM Glucose. Die Desensitisierung war nicht mit einer Abnahme des cytosolischen Calciumsignals in intakten Inseln verbunden. Das Reaktionsmuster der mit Fura messbaren cytosolischen Calciumkonzentration war in kontroll-kultivierten, desensitisierten und erholten Inseln gleich. Dieser Befund passt zu früher erhobenen Befunden, dass die  $K_{ATP}$ -Kanal-Aktivität von Tolbutamid- oder Efaroxan-desensitisierten Zellen nicht signifikant vermindert ist. (RUSTENBECK *et al.* 2001a; RUSTENBECK *et al.* 2004b).

Mit der Elektronenmikroskopie ist bereits in früheren Untersuchungen eine Abnahme der Insulingranula durch die Desensitisierung mittels Efaroxan (RUSTENBECK *et al.* 2004b) und Tolbutamid (RUSTENBECK *et al.* 2001b) gefunden worden. Diese Befunde wurden durch die jetzigen Untersuchungen bestätigt und erweitert. Sowohl die Exposition mit 100  $\mu$ M Efaroxan als auch mit 500  $\mu$ M Tolbutamid für 20 Stunden induzierte eine starke Verminderung der Anzahl gut granulierter  $\beta$ -Zellen. Das Ausmaß der Verminderung war nach der Tolbutamid-Exposition in den meisten  $\beta$ -Zellen ausgeprägter als nach Efaroxan-Exposition, allerdings war nach der vierstündigen Kultur ohne Stimulus (Erholungsphase) die Regranulation in den zuvor Tolbutamid-exponierten Inseln weiter fortgeschritten. Somit korreliert der Bestand an Insulingranula zwar global mit der verminderten sekretorischen Responsivität, nicht jedoch mit der funktionellen Erholung. Insbesondere ist durch den Granulationsstatus nicht der auch in der Desensitisierung zu erkennende Unterschied in der

Glucoseabhängigkeit von Efaroxan und Tolbutamid zu erklären. Die Auffassung von Jack Leahy (HOSOKAWA und LEAHY 1997), dass die Desensibilisierung auf einer Depletion des freisetzbaren Insulins beruht (sog. „exhausted“ oder „over worked“  $\beta$ -Zelle) ist insofern als zu stark vereinfachend zu bezeichnen.

Die Beobachtung der Degranulation in transfizierten MIN6-Zellen mittels der Fluoreszenz der Sekretgranula verfolgte zwei Ziele: 1) eine Aussage über die Verwendungsfähigkeit des Labels auch ohne dauerhaften Zugang zur TIRF-Mikroskopie zu ermöglichen und 2) den oben dargestellten Unterschied zwischen den Effekten von Efaroxan und Tolbutamid in einem anderen System zu verifizieren. Die Beobachtung, dass Efaroxan in transfizierten wie auch in Kontroll-MIN6-Zellen eine Stimulation der Insulinsekretion bewirkte (s. Kapitel 4.5), ließ diese Zelllinie als zulässiges Modell für die Induktion der Desensibilisierung erscheinen.

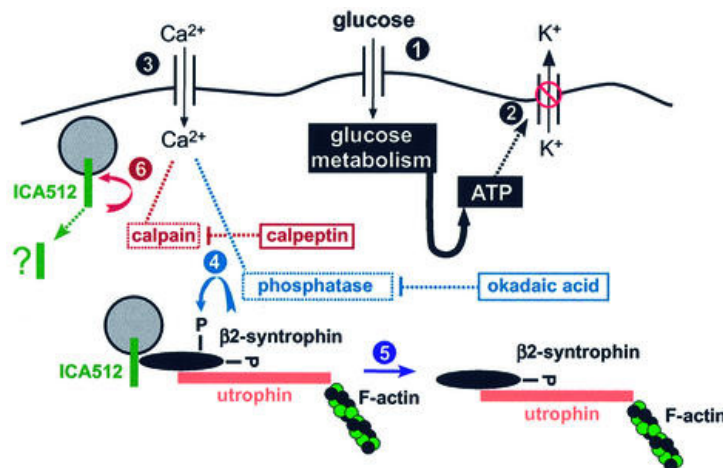
Auch in diesem System war zu beobachten, dass Tolbutamid stärker degranulierend wirkte als Efaroxan. Bei Tolbutamid-exponierten MIN6-Zellen zeigte sich eine Reduktion des Granulabestandes um ca. 40%, bei Efaroxan-exponierten um nur ca. 25%. Die Wiederauffüllung war jedoch nach Tolbutamid-Exposition ausgeprägter als nach Efaroxan-Exposition. Diese Daten weisen darauf hin, dass der Sulfonylharnstoff Tolbutamid stärker degranulierend wirkt als Efaroxan. Die funktionelle Erholung korreliert nicht mit dem Granulabestand, was auf unterschiedliche Mechanismen der Tolbutamid- und Efaroxan-induzierten Desensibilisierung hinweist.

Die geringere augenscheinliche Degranulation mit Tolbutamid in diesen Versuchen verglichen mit Versuchen bei denen der Granulationstatus mittels Elektronenmikroskopie untersucht wurde ist wahrscheinlich auf die unterschiedliche Art der Auswertung zurückzuführen. Während in den Versuchen der Insulin-EGFP-Markierung alle Granula, die dem Einschlusskriterium genügten, erfasst wurden, wurden bei der Auswertung der Elektronenmikroskopie die  $\beta$ -Zellen in die Kategorie granuliert oder degranuliert eingeteilt und die Zahl der degranulierten prozentual dargestellt. Auf die erstere Weise wurde der Granulabestand proportional dargestellt während auf die letztere Weise nur eine qualitative Unterscheidung in zwei Kategorien vorgenommen wurde, wodurch die Effektstärke überschätzt werden kann. Es ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, dass in einer Untersuchung der Gruppe um Seino (KAWAKI et al. 1999) die Glibenclamid-Desensibilisierung hier zu einer Reduktion des immunogen aktiven Insulins auf ca.  $\frac{3}{4}$  des Kontrollwerts geführt hatte. Durch die Anwesenheit cytosolischer Aggregate kann es bei den Messungen



(s. Kapitel 4.7.4), in denen dieser Bestand nicht ausgewaschen wurde, zu falsch hohen Werten gekommen sein. Konkret heißt das, dass die degranulierende Wirkung von Tolbutamid wahrscheinlich intensiver ist als in den Zahlen zum Ausdruck kommt.

Die Beobachtung, dass eine halbstündige Kalium-Depolarisation zu einer Zunahme des Granulabestandes führt war unerwartet. In einer früheren Untersuchung war nachgewiesen worden, dass es nach 24stündiger Kalium-Exposition zu einer Degranulation des Bestandes der  $\beta$ -Zellen kam (RUSTENBECK et al. 2001b). Möglich ist die Erklärung, dass eigentlich keine Zunahme des Bestandes selber vorlag, sondern eine verstärkte Marginalisation, so dass die Granula intensiver fluoreszierten und so eher eine Chance hatten, den Schwellenwert für die Erkennung zu überschreiten. Andererseits sind tatsächlich Effekte auf die Insulinbiosynthese in relativ kurzfristigen Zeiträumen möglich. So kann mit einer stimulatorischen Glucosekonzentration die Synthese 15fach innerhalb von 60 Minuten gesteigert werden, wobei die mRNA-Menge sich praktisch nicht verändert, die gesteigerte Synthese also durch vermehrte Translation erklärlich ist (WICKSTEED et al. 2003). Ein Mechanismus wie die gesteigerte Insulin-Biosynthese von gesteigerter Bildung von Sekretgranula begleitet wird, stellt die Translokation von polypyrimidin tract-binding proteins dar. Diese stabilisieren nach dem Export aus dem Nukleus die mRNAs von Granula-assoziierten Proteinen, wodurch es ca. 30 Minuten nach einem Stimulus zu einer erkennbaren Vermehrung der Granula kommt (KNOCH et al. 2004).



**Abb. 5.4 Exozytose-abhängige Freisetzung von ICA512**, einem granulären Protein, welches als Transkriptionsfaktor die Neusynthese von Granula fördert. Abbildung adaptiert aus ORT et al. The EMBO Journal 20, S 4013-23.

Zwar wurde von der Gruppe um Rhodes berichtet, dass ein Block des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals, im Gegensatz zu einer GLP-1 Stimulation, nicht zu einer vermehrten Proinsulin-Translation führt, jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kalium-Depolarisation mit 40 mM durchgeführt, was einen wesentlich stärkeren depolarisierenden Stimulus darstellt als der Block des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals (ALARCON et al. 2006). Ein von dem Ausmaß der Exozytose abhängigen Feedback-Mechanismus hat kürzlich die Gruppe um Solimena vorgeschlagen: hierbei wird ein intrinsisches granuläres Protein, ICA512/IA-2, freigesetzt und führt indirekt zur vermehrten Expression von Granulumproteinen (Abb. 5.4), (ORT et al. 2001).

Der Transkriptionsfaktor PDX-1 gilt als wichtigster Vermittler für die glucoseabhängige Steigerung der Insulinbiosynthese, (MACFARLANE et al. 2000), (MELLOUL et al. 2002). Darüberhinaus ist PDX-1 wichtig für die embryonale Differenzierung des endokrinen Pankreas und für die Aufrechterhaltung der ausgereiften  $\beta$ -Zell-Funktion (KANETO et al. 2008), (CERF et al. 2006). Chronisch erhöhte Glukosekonzentrationen führen jedoch, unter anderem über eine Hemmung der Insulingen-Expression (POITOUT et al. 2006), zu einer gestörten  $\beta$ -Zell-Funktion. Ursache dafür ist eine verminderte Bindungsaktivität von PDX-1 an das Präproinsulin-Gen (POITOUT et al. 2006).

Bisher ist unklar, wie der Energiestoffwechsel der  $\beta$ -Zelle die PDX-1 Expression reguliert; eine naheliegende Regulation durch die cytosolische Calciumkonzentration konnte jedoch nicht bestätigt werden (MACFARLANE *et al.* 2000). Als Calcium-unabhängiger Regulator käme eine Änderung des Durchsatzes durch die Pyruvat-Carboxylase (PC) und Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) in Betracht. Eine durch PC-Aktivität bedingte Anaplerose ist essentiell für die Glucose-induzierte Insulinsekretion (FRANSSON *et al.* 2006). Die Gruppe um Newsholme beobachtete kürzlich, dass eine längerfristige (18 Stunden) Exposition mit Tolbutamid die PC-abhängige Anaplerose hemmt (BRENNAN *et al.* 2006). Somit könnten die aus der Anaplerose stammenden metabolischen Kopplungssignale (MACDONALD *et al.* 2005) auch für die PDX-1-Menge regulierend wirken.

Im Rahmen dieser Arbeit war zu beobachten, dass eine 20stündige Exposition von MIN6-Pseudoinseln sowohl mit Efaroxan als auch mit Tolbutamid zu einer signifikanten Abnahme der Expression von PDX-1 führt. Die Abnahme der PDX-1 Expression würde unter diesen Bedingungen zur Abnahme der Zahl an Sekretgranula passen. Untersuchungen haben aber gezeigt, dass die mRNA des Präproinsulin-Gens für ca. 20 Stunden stabil ist (IYPE *et al.* 2005). Demnach wäre die Ursache der beobachteten Verminderung an Sekretgranula für den betrachteten Zeitraum nicht auf Transkriptionsebene zu vermuten.

Warum kommt es zur Verminderung der PDX-1 Expression? Der Energiestoffwechsel scheint, dem unveränderten ATP-Gehalt nach zu urteilen (s.u.), durch die Desensitisierung nicht gehemmt zu werden. Boucher *et al.* zeigten jedoch, dass die Halbwertszeit des PDX-1 Proteins verringert sein kann, wenn die Zellen oxydativem Stress ausgesetzt sind. Es kommt dabei zu einem Verlust der inhibitorischen Wirksamkeit von Glycogen-Synthase-Kinase-3, der zur Folge hat, dass PDX-1 vermehrt proteosomal abgebaut wird (BOUCHER *et al.* 2006). Der längerfristig erhöhte Calciumeinstrom durch die Tolbutamid- bzw. Efaroxan-Exposition und die damit verbundene vermehrte mitochondriale Calciumbeladung könnte ähnliche Folgen haben.

Für solche Prozesse, die vorwiegend von der ATP-Konzentration bestimmt werden, ergibt sich aus den Daten dieser Arbeit kein Hinweis auf eine Veränderung im Rahmen der Desensitisierung. Da der ATP-Gehalt durch die Exposition der Inseln mit Efaroxan oder Tolbutamid nicht signifikant vermindert ist, ergibt sich kein direkter

Hinweis darauf, dass die Desensitisierung durch eine Hemmung energieverbrauchender Prozesse zu erklären ist. Dies könnte jedoch der Fall sein, wenn ein bestimmter Prozess vom Quotienten der ATP/ADP-Konzentrationen bestimmt wird, da die ADP-Konzentration im Vergleich zu den frisch isolierten Inseln durch die Kultur signifikant vermindert wurde. Die Einwirkung von Efaroxan oder Tolbutamid während der Kultivierungsphase führte dagegen nicht zu einer Änderung der ATP- und ADP-Konzentrationen. Es ist also die Zellkultur an sich, die zu einer Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten führt, wie es auch von Detimary et al. beschrieben wurde (DETIMARY et al. 1995).

Es ist derzeit umstritten, ob die Aktivität des  $K_{ATP}$ -Kanals durch die ATP/ADP-Ratio oder vorwiegend durch die  $ATP^{4-}$ -Konzentration reguliert wird. Wenn für die Desensitisierung schnell auswaschbare Substanzen (RUSTENBECK *et al.* 2004b) wie Tolbutamid verwendet wurden, so war im desensitisierten Zustand kein Effekt auf die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität feststellbar (RUSTENBECK *et al.* 2001a), ebenso war kein Effekt auf die cytosolische Calciumkonzentration von einzelnen  $\beta$ -Zellen erkennbar (RUSTENBECK *et al.* 2004b) und auch nicht auf die cytosolische Calciumkonzentration von intakten Pankreasinseln (diese Arbeit, s. Kapitel 4.7.2, Abb. 4.30). Möglicherweise betrifft die Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten nicht die cytosolische Situation, da der granuläre Gehalt an ADP relativ höher ist als derjenige von ATP (DETIMARY *et al.* 1996a), sich also durch eine Veränderung der Zahl der Granula ein relativ stärkerer Verlust von ADP als von ATP ergeben müsste. Insofern erscheint die Schlussfolgerung gerechtfertigt, dass durch die Zellkultur der  $K_{ATP}$ -Kanal-abhängige Signalweg („triggering pathway“) nicht wesentlich beeinflusst wird.

## 6. Zusammenfassung

Die Mechanismen der Glucose-induzierten Insulinsekretion sind noch immer in weiten Bereichen unverstanden. Dies betrifft vor allem den Bereich der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Signaltransduktion. Es ist in den letzten 10 Jahren deutlich geworden, dass die Kopplung des Energiestoffwechsels der  $\beta$ -Zelle über den  $K_{ATP}$ -Kanal an die elektrische Erregbarkeit und die cytosolische Calciumkonzentration das tatsächliche Ausmaß der durch Nährstoffe stimulierten Sekretion nur sehr unvollkommen erklären kann. Im Gegensatz zu den  $K_{ATP}$ -Kanal-vermittelten Signalen, die in der Änderung der cytosolischen Calciumkonzentration resultieren, fehlt bezüglich der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Signale (Kandidaten sind u.a. Glutamat, NADPH und Malonyl-CoA) ein gemeinsamer, leicht zu messender Parameter mit unmittelbarer Relevanz für die Insulinsekretion. Mögliche Diskrepanzen zwischen Änderungen der cytosolischen Calciumkonzentration und der tatsächlich gemessenen Sekretion lassen sich am ehesten mit einem unterschiedlichen Bestand an sekretionsbereiten Granula erklären. Insofern ergab sich als primäre Aufgabenstellung für diese Arbeit die Entwicklung eines spezifischen Labels für die Insulin-Sekretgranula, wodurch es möglich sein sollte, den gesamten Granulabestand von  $\beta$ -Zellen und, bei Verwendung der TIRF-Mikroskopie, die membranassoziierten und damit unmittelbar sekretionsbereiten Granula zu quantifizieren.

Die Publikationslage war zu Beginn dieser Arbeit widersprüchlich hinsichtlich der Möglichkeit, Insulin mit EGFP zu markieren, und dadurch eine selektive Darstellung der Insulin-Sekretgranula in der  $\beta$ -Zelle zu erreichen. Diese Vorgehensweise wurde deshalb gewählt, da so die Möglichkeit bestand, neben der Menge und Bewegung der Granula auch die Exozytose selbst als Freisetzung von fluoreszierendem Material beobachten zu können. Die Markierung der Insulingranula gelang mit einem Fusionsprotein aus dem humanen Präproinsulin und C-terminalem EGFP, die über einen „Spacer“ von sieben Aminosäuren mit der Sequenz -Gly-Asp-Pro-Pro-Val-Ala-Thr- miteinander verbunden waren. Die bei transient transfizierten insulinproduzierenden Zelllinien zur beobachtende granuläre Fluoreszenz blieb auch bei Permeabilisierung der Plasmamembran erhalten, was mit einer Lokalisation in einem granulären Kompartiment vereinbar ist. Darüber hinaus konnte mittels TIRF-Mikroskopie von transfizierten RINm5F-Zellen gezeigt werden, dass diese

fluoreszierenden Granula auf eine Kalium-Depolarisation mit vermehrter Bewegung und einer Änderung der Fluoreszenzemission reagierten. Diese Änderung war allerdings nicht bei allen Granula gleichartig, deutlich vorherrschend war jedoch eine vorübergehende Intensivierung und danach Verlöschen der Fluoreszenz.

Aufgrund dieser Erfahrungen wurden zwei weitere Insulin-Fusionsproteine generiert. Eines an dessen C-terminalen Ende der A-Kette das rot fluoreszierende tdimer Protein gebunden war, und eines, bei dem sich an der gleichen Stelle das sogenannte timer-Protein befand. Mit allen drei Konstrukten (Insulin-EGFP, Insulin-tdimer und Insulin-timer) wurden stabil transfizierte insulinproduzierende Zelllinien (MIN6-Zellen) hergestellt. Die Zelllinien wurden zur weiteren funktionellen Charakterisierung verwendet. Hierbei sollte 1) das Verhältnis der Freisetzung des Fusionsproteins zur Freisetzung des endogenen Insulin bestimmt werden und 2) der Granulationsstatus im Laufe einer depolarisationsinduzierten Desensitisierung gemessen werden.

Bei der Messung der Sekretion stellte sich jedoch heraus, dass die Sekretion an humanem C-Peptid äußerst niedrig war, obwohl immunohistochemisch ein deutlicher C-Peptid-Gehalt in den Granula feststellbar war. Wahrscheinlich wird das Fusionsprotein nicht vollständig prozessiert. Es gelangt somit als unvollständig gespaltenes Proinsulin zur Ausschüttung und wird vom C-Peptid-Antikörper des verwendeten ELISA nicht erkannt. Prinzipiell sind jedoch die stabil transfizierten MIN6-Zellen gut auf depolarisierende Stimuli ansprechbar, was sich auch bei der Messung der cytosolischen Calciumkonzentration und des Membranpotentials bestätigte.

Bei der Messung der Degranulation und Regranulation im Rahmen der Desensitisierung durch  $K_{ATP}$ -Kanal-Blocker (Tolbutamid und Efaroxan), stellte sich heraus, dass die Verwendung von stabil transfizierten MIN6-Zellen nicht so problemlos war wie anfänglich erwartet. Nach zwei bis drei Tagen in Kultur wiesen die Zellen extragranuläre fluoreszierende Depots auf, die als Granula fehlinterpretiert werden konnten. Nach Permeabilisierung der Plasmamembran wurden die Depots jedoch ausgewaschen und der tatsächliche Bestand an Insulingranula konnte bestimmt werden. Somit waren jedoch mit diesen Zelllinien nur Endpunktmessungen möglich und für die Beobachtung der Granulation zu mehreren Zeitpunkten mussten transient transfizierte MIN6-Zellen verwendet werden.

Insgesamt ergab die Messung des Granulabestands nach Desensibilisierung eine deutliche Reduktion der Granulazahl, wie sie auch mit der Elektronenmikroskopie an  $\beta$ -Zellen gesehen worden waren. Interessanterweise war die Regranulation nach Tolbutamid-Desensibilisierung schneller als nach Efaroxan-Desensibilisierung, obwohl sich die Sekretion nach Tolbutamid-Desensibilisierung langsamer erholte.

Die Messung von weiteren Parametern während der Desensibilisierung und Erholung (PDX-1, cytosolische Calciumkonzentration, ATP- und ADP-Konzentrationen) wies darauf hin, dass PDX-1 auch in Abhängigkeit vom Membranpotential reguliert wird, dass aber die Änderung von PDX-1 nicht für die nach vier Stunden wiederkehrende Regranulation ursächlich sein kann.

Die in dieser Arbeit entstandenen Fluoreszenz-Label der Insulin-Sekretgranula sind also prinzipiell dafür verwendbar, die  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Signalwege weiter aufzuklären. Es ist allerdings vonnöten, die Rahmenbedingungen sorgfältig zu charakterisieren, d.h. die Art der verwendeten Zelllinie zu beachten, insbesondere ob diese stabil oder transient transfiziert vorliegt. Grundsätzlich ist die Transfektion von primären  $\beta$ -Zellen oder Inseln anzustreben.

Für die Desensibilisierung der Insulinsekretion zeigte sich, dass sich das Ausmaß der Degranulation für die zwei verschiedenen  $K_{ATP}$ -Kanal-blockierenden Pharmaka Tolbutamid und Efaroxan unterscheidet. Ganz deutlich ist die Dissoziation zwischen dem Ausmaß der Regranulation und der Erholung der Insulinsekretion, obwohl die cytosolische Calciumkonzentration unverändert bleibt. Diese Diskrepanz unterstreicht die Bedeutung der  $K_{ATP}$ -Kanal-unabhängigen Signale, die es weiterhin zu identifizieren gilt.

## 7. Literaturverzeichnis

- AHREN B: Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): a gut hormone of potential interest in the treatment of diabetes. *Bioessays* 20: 642-51, 1998
- AHREN B and LUNDQUIST I: Effects of alpha-adrenoceptor blockade by phentolamine on basal and stimulated insulin secretion in the mouse. *Acta Physiol Scand* 125: 211-7, 1985
- ALARCON C, WICKSTEED B and RHODES C J: Exendin 4 controls insulin production in rat islet beta cells predominantly by potentiation of glucose-stimulated proinsulin biosynthesis at the translational level. *Diabetologia* 49: 2920-9, 2006
- ALBERTI K G: Treating type 2 diabetes--today's targets, tomorrow's goals. *Diabetes Obes Metab* 3 Suppl 1: S3-10, 2001
- AMMALA C, ELIASSON L, BOKVIST K, BERGGREN P O, HONKANEN R E, SJOHOLM A and RORSMAN P: Activation of protein kinases and inhibition of protein phosphatases play a central role in the regulation of exocytosis in mouse pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4343-7, 1994
- ASFARI M, JANJIC D, MEDA P, LI G, HALBAN P A and WOLLHEIM C B: Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130: 167-78, 1992
- ASHCROFT F M and RORSMAN P: Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol* 54: 87-143, 1989
- ASHCROFT S J and RANDLE P J: Control of insulin release by glucose. *Proc R Soc Med* 61: 814-5, 1968
- ATWATER I, MEARS D and ROJAS E: Electrophysiology of the pancreatic B-cell. *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. Philadelphia, LeRoith D, Taylor SI; Lippincott: 79-102, 1996
- BAILEY C J and TURNER R C: Metformin. *N Engl J Med* 334: 574-9, 1996
- BAIRD G S, ZACHARIAS D A and TSIEN R Y: Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11984-9, 2000
- BALL A J, FLATT P R and MCCLENAGHAN N H: Stimulation of insulin secretion in clonal BRIN-BD11 cells by the imidazoline derivatives KU14r and RX801080. *Pharmacol Res* 42: 575-9, 2000
- BARG S, ELIASSON L, RENSTROM E and RORSMAN P: A subset of 50 secretory granules in close contact with L-type  $Ca^{2+}$  channels accounts for first-phase insulin secretion in mouse beta-cells. *Diabetes* 51 Suppl 1: S74-82, 2002a



- BARG S, OLOFSSON C S, SCHRIEVER-ABELN J, WENDT A, GEBRE-MEDHIN S, RENSTROM E and RORSMAN P: Delay between fusion pore opening and peptide release from large dense-core vesicles in neuroendocrine cells. *Neuron* 33: 287-99, 2002b
- BERNARDI P and FORTE M: The mitochondrial permeability transition pore. *Novartis Found Symp* 287: 157-64; discussion 164-9, 2007
- BHATHENA S J, OIE H K, GAZDAR A F, VOYLES N R, WILKINS S D and RECANT L: Insulin, glucagon, and somatostatin receptors on cultured cells and clones from rat islet cell tumor. *Diabetes* 31: 521-31, 1982
- BLECK C: Untersuchungen zu Mechanismen der glucoseselektiven Steigerung der Insulinsekretion durch Imidazoline, Technische Universität Braunschweig, 2006
- BLECK C, WIENBERGEN A and RUSTENBECK I: Glucose dependence of imidazoline-induced insulin secretion: different characteristics of two ATP-Sensitive K<sup>+</sup> channel-blocking compounds. *Diabetes* 53 Suppl 3: S135-9, 2004
- BLECK C, WIENBERGEN A and RUSTENBECK I: Essential role of the imidazoline moiety in the insulinotropic effect but not the K<sub>ATP</sub> channel-blocking effect of imidazolines; a comparison of the effects of efaroxan and its imidazole analogue, KU14R. *Diabetologia* 48: 2567-75, 2005
- BODEN G: Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46: 3-10, 1997
- BOKVIST K, ELIASSON L, AMMALA C, RENSTROM E and RORSMAN P: Co-localization of L-type Ca<sup>2+</sup> channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *Embo J* 14: 50-7, 1995
- BOUCHER M J, SELANDER L, CARLSSON L and EDLUND H: Phosphorylation marks IPF1/PDX1 protein for degradation by glycogen synthase kinase 3-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 281: 6395-403, 2006
- BOULTON A J: The diabetic foot: a global view. *Diabetes Metab Res Rev* 16 Suppl 1: S2-5, 2000
- BRADFORD M M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54, 1976
- BRATANOVA-TOCHKOVA T K, CHENG H, DANIEL S, GUNAWARDANA S, LIU Y J, MULVANEY-MUSA J, SCHERMERHORN T, STRAUB S G, YAJIMA H and SHARP G W: Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* 51 Suppl 1: S83-90, 2002
- BRENNAN L, HEWAGE C, MALTHOUSE J P, MCCLENAGHAN N H, FLATT P R and NEWSHOLME P: Investigation of the effects of sulfonylurea exposure on pancreatic beta cell metabolism. *Febs J* 273: 5160-8, 2006

- BROADSTONE V L, PFEIFER M A, BAJAJ V, STAGNER J I and SAMOLS E: Alpha-adrenergic blockade improves glucose-potentiated insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 36: 932-7, 1987
- BRYAN J and AGUILAR-BRYAN L: Sulfonylurea receptors: ABC transporters that regulate ATP-sensitive K(+) channels. *Biochim Biophys Acta* 1461: 285-303, 1999
- BUTLER A E, JANSON J, BONNER-WEIR S, RITZEL R, RIZZA R A and BUTLER P C: Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 102-10, 2003
- BYRNE M M, STURIS J, O'MEARA N M and POLONSKY K S: Insulin secretion in humans: physiologic regulation and alternation in disease states. *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. Philadelphia, LeRoith D, Taylor SI; Lippincott: 3-11, 1996
- CAHILL G F, JR.: Beta-cell deficiency, insulin resistance, or both? *N Engl J Med* 318: 1268-70, 1988
- CALLEWAERT H, GYSEMANS C, CARDOZO A K, ELSNER M, TIEDGE M, EIZIRIK D L and MATHIEU C: Cell loss during pseudoislet formation hampers profound improvements in islet lentiviral transduction efficacy for transplantation purposes. *Cell Transplant* 16: 527-37, 2007
- CAMPBELL R E, TOUR O, PALMER A E, STEINBACH P A, BAIRD G S, ZACHARIAS D A and TSIEN R Y: A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7877-82, 2002
- CERF M E, MULLER C J, DU TOIT D F, LOUW J and WOLFE-COOTE S A: Hyperglycaemia and reduced glucokinase expression in weanling offspring from dams maintained on a high-fat diet. *Br J Nutr* 95: 391-6, 2006
- CHAN S L, ATLAS D, JAMES R F and MORGAN N G: The effect of the putative endogenous imidazoline receptor ligand, clonidine-displacing substance, on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. *Br J Pharmacol* 120: 926-32, 1997
- CHAN S L, BROWN C A and MORGAN N G: Stimulation of insulin secretion by the imidazoline alpha 2-adrenoceptor antagonist efaroxan is mediated by a novel, stereoselective, binding site. *Eur J Pharmacol* 230: 375-8, 1993
- CHAN S L, BROWN C A, SCARPELLO K E and MORGAN N G: The imidazoline site involved in control of insulin secretion: characteristics that distinguish it from I1- and I2-sites. *Br J Pharmacol* 112: 1065-70, 1994
- CHAN S L, DUNNE M J, STILLINGS M R and MORGAN N G: The alpha 2-adrenoceptor antagonist efaroxan modulates K<sup>+</sup>ATP channels in insulin-secreting cells. *Eur J Pharmacol* 204: 41-8, 1991

- CHAN S L and MORGAN N G: Stimulation of insulin secretion by efaroxan may involve interaction with potassium channels. *Eur J Pharmacol* 176: 97-101, 1990
- CHAN S L, PALLETT A L, CLEWS J, RAMSDEN C A, CHAPMAN J C, KANE C, DUNNE M J and MORGAN N G: Characterisation of new efaroxan derivatives for use in purification of imidazoline-binding sites. *Eur J Pharmacol* 355: 67-76, 1998
- COLQUHOUN D and SIGWORTH F J: "Fitting and statistical analysis of single channel records". *Single Channel Recording*. B. Sakmann and E. Neher. New York, London, Plenum Press: 499-501, 1995
- COORE H G and RANDLE P J: Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro. *Biochem J* 93: 66-78, 1964
- CREUTZFELDT W: The entero-insular axis in type 2 diabetes--incretins as therapeutic agents. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 Suppl 2: S288-303, 2001
- DEAN P M: Ultrastructural morphometry of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Diabetologia* 9: 115-9, 1973
- DEAN P M and MATTHEWS E K: Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* 219: 389-90, 1968
- DETIMARY P, JONAS J C and HENQUIN J C: Possible links between glucose-induced changes in the energy state of pancreatic B cells and insulin release. Unmasking by decreasing a stable pool of adenine nucleotides in mouse islets. *J Clin Invest* 96: 1738-45, 1995
- DETIMARY P, JONAS J C and HENQUIN J C: Stable and diffusible pools of nucleotides in pancreatic islet cells. *Endocrinology* 137: 4671-6, 1996a
- DETIMARY P, VAN DEN BERGHE G and HENQUIN J C: Concentration dependence and time course of the effects of glucose on adenine and guanine nucleotides in mouse pancreatic islets. *J Biol Chem* 271: 20559-65, 1996b
- DUBRIDGE R B, TANG P, HSIA H C, LEONG P M, MILLER J H and CALOS M P: Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7: 379-87, 1987
- DULL T, ZUFFEREY R, KELLY M, MANDEL R J, NGUYEN M, TRONO D and NALDINI L: A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72: 8463-71, 1998
- DUNCAN R R, GREAVES J, WIEGAND U K, MATSKEVICH I, BODAMMER G, APPS D K, SHIPSTON M J and CHOW R H: Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age. *Nature* 422: 176-80, 2003
- DUNNE M J, HARDING E A, JAGGAR J H and SQUIRES P E: Ion channels and the molecular control of insulin secretion. *Biochem Soc Trans* 22: 6-12, 1994

- DUNNE M J and PETERSEN O H: Potassium selective ion channels in insulin-secreting cells: physiology, pharmacology and their role in stimulus-secretion coupling. *Biochim Biophys Acta* 1071: 67-82, 1991
- EFANOV A M, ZAITSEV S V, MEST H J, RAAP A, APPELSKOG I B, LARSSON O, BERGGREN P O and EFENDIC S: The novel imidazoline compound BL11282 potentiates glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells in the absence of modulation of K(ATP) channel activity. *Diabetes* 50: 797-802, 2001
- EFENDIC S, EFANOV A M, BERGGREN P O and ZAITSEV S V: Two generations of insulintropic imidazoline compounds. *Diabetes* 51 Suppl 3: S448-54, 2002
- ELIASSON L, RENSTROM E, DING W G, PROKS P and RORSMAN P: Rapid ATP-dependent priming of secretory granules precedes  $\text{Ca}^{(2+)}$ -induced exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 503 ( Pt 2): 399-412, 1997
- ENGVALL E, JONSSON K and PERLMANN P: Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta* 251: 427-34, 1971
- ENGVALL E and PERLMAN P: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871-4, 1971
- FERRANNINI E: Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev* 19: 477-90, 1998
- FRANSSON U, ROSENGREN A H, SCHUIT F C, RENSTROM E and MULDER H: Anaplerosis via pyruvate carboxylase is required for the fuel-induced rise in the ATP:ADP ratio in rat pancreatic islets. *Diabetologia* 49: 1578-86, 2006
- GALLWITZ B, ROPETER T, MORYS-WORTMANN C, MENTLEIN R, SIEGEL E G and SCHMIDT W E: GLP-1-analogues resistant to degradation by dipeptidyl-peptidase IV in vitro. *Regul Pept* 86: 103-11, 2000
- GASMI M, GLYNN J, JIN M J, JOLLY D J, YEE J K and CHEN S T: Requirements for efficient production and transduction of human immunodeficiency virus type 1-based vectors. *J Virol* 73: 1828-34, 1999
- GAZDAR A F, CHICK W L, OIE H K, SIMS H L, KING D L, WEIR G C and LAURIS V: Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 3519-23, 1980
- GEMBAL M, DETIMARY P, GILON P, GAO Z Y and HENQUIN J C: Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate-sensitive  $\text{K}^+$  channels in mouse B cells. *J Clin Invest* 91: 871-80, 1993
- GEMBAL M, GILON P and HENQUIN J C: Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels in mouse B cells. *J Clin Invest* 89: 1288-95, 1992

- GERICH J E: The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 19: 491-503, 1998
- GERMAN M S: Glucose sensing in pancreatic islet beta cells: the key role of glucokinase and the glycolytic intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1781-5, 1993
- GHOSH A, RONNER P, CHEONG E, KHALID P and MATSCHINSKY F M: The role of ATP and free ADP in metabolic coupling during fuel-stimulated insulin release from islet beta-cells in the isolated perfused rat pancreas. *J Biol Chem* 266: 22887-92, 1991
- GIANI G, JANKA HU, HAUNER H, STANDL E, SCHIEL R, NEU A, RATHMANN W and J R: Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. Aktualisierte Version auf den Webseiten der DDG „[www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/](http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/)“ Evidenzbasierte Leitlinien/Epidemiologie. Scherbaum WA, Kiess, W (Hrsg.). Mai 2004 2, 2004
- GIANNOUKAKIS N, MI Z, GAMBOTTO A, ERAMO A, RICORDI C, TRUCCO M and ROBBINS P: Infection of intact human islets by a lentiviral vector. *Gene Ther* 6: 1545-51, 1999
- GOTOH M, MAKI T, KIYOIZUMI T, SATOMI S and MONACO A P: An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. *Transplantation* 40: 437-8, 1985
- GROMADA J, HOY M, RENSTROM E, BOKVIST K, ELIASSON L, GOPEL S and RORSMAN P: CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 518 ( Pt 3): 745-59, 1999
- GROSSE-LACKMANN T, ZUNKLER B J and RUSTENBECK I: Specificity of nonadrenergic imidazoline binding sites in insulin-secreting cells and relation to the block of ATP-sensitive K(+) channels. *Ann N Y Acad Sci* 1009: 371-7, 2003
- GRYNKIEWICZ G, POENIE M and TSIEN R Y: A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-50, 1985
- HALBAN P A, PRAZ G A and WOLLHEIM C B: Abnormal glucose metabolism accompanies failure of glucose to stimulate insulin release from a rat pancreatic cell line (RINm5F). *Biochem J* 212: 439-43, 1983
- HÄRING H and MATTHAEI S: Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2. Hrsg. Scherbaum WA. Diabetologie und Stoffwechsel 2006; 1 Suppl 2: S205-210, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, New York, 2006

- HÄRING H U, JOOST H G, LAUBE H, MATTHAEI S, MEISSNER H P, PANTEN U and SCHERNTHANER G: Antihyperglykämische Therapie des Diabetes mellitus Typ 2. Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinie DDG. Hrsg. Scherbaum WA, Landgraf R. Diabetes und Stoffwechsel, Band 12, Suppl. 2, Kirchheim, Mainz, 2003
- HAUGE-EVANS A C, SQUIRES P E, BELIN V D, RODERIGO-MILNE H, RAMRACHEYA R D, PERSAUD S J and JONES P M: Role of adenine nucleotides in insulin secretion from MIN6 pseudoislets. *Mol Cell Endocrinol* 191: 167-76, 2002
- HAUGE-EVANS A C, SQUIRES P E, PERSAUD S J and JONES P M: Pancreatic beta-cell-to-beta-cell interactions are required for integrated responses to nutrient stimuli: enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  and insulin secretory responses of MIN6 pseudoislets. *Diabetes* 48: 1402-8, 1999
- HAUNER H: Verbreitung des Diabetes mellitus in Deutschland. *Dtsch Med Wschr* 123: 777-782, 1998
- HAUNER H, VON FERBER L and KOSTER I: [Estimation of the incidence of diabetes in the Federal Republic of Germany based on insurance data. A secondary data analysis of a representative random sample of locally insured persons in the city of Dortmund]. *Dtsch Med Wochenschr* 117: 645-50, 1992
- HE Z, WANG F, KUMAGAI-BRAESCH M, PERMERT J and HOLGERSSON J: Long-term gene expression and metabolic control exerted by lentivirus-transduced pancreatic islets. *Xenotransplantation* 13: 195-203, 2006
- HELLER G, GUNSTER C and SCHELLSCHMIDT H: [How frequent are diabetes-related amputations of the lower limbs in Germany? An analysis on the basis of routine data]. *Dtsch Med Wochenschr* 129: 429-33, 2004
- HENQUIN J C: Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49: 1751-60, 2000
- HENQUIN J C, GEMBAL M, DETIMARY P, GAO Z Y, WARNOTTE C and GILON P: Multisite control of insulin release by glucose. *Diabete Metab* 20: 132-7, 1994
- HENQUIN J C and MEISSNER H P: Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic B-cells. *Experientia* 40: 1043-52, 1984
- HOLST J J and DEACON C F: Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes* 47: 1663-70, 1998
- HOSOKAWA Y A and LEAHY J L: Parallel reduction of pancreas insulin content and insulin secretion in 48-h tolbutamide-infused normoglycemic rats. *Diabetes* 46: 808-13, 1997

- ISHIHARA H, ASANO T, TSUKUDA K, KATAGIRI H, INUKAI K, ANAI M, KIKUCHI M, YAZAKI Y, MIYAZAKI J I and OKA Y: Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia* 36: 1139-45, 1993
- IYPE T, FRANCIS J, GARMEY J C, SCHISLER J C, NESHER R, WEIR G C, BECKER T C, NEWGARD C B, GRIFFEN S C and MIRMIRA R G: Mechanism of insulin gene regulation by the pancreatic transcription factor Pdx-1: application of pre-mRNA analysis and chromatin immunoprecipitation to assess formation of functional transcriptional complexes. *J Biol Chem* 280: 16798-807, 2005
- JANJIC D, MAECHLER P, SEKINE N, BARTLEY C, ANNEN A S and WOLHEIM C B: Free radical modulation of insulin release in INS-1 cells exposed to alloxan. *Biochem Pharmacol* 57: 639-48, 1999
- JONAS J C, PLANT T D, ANGEL I, LANGER S Z and HENQUIN J C: In vitro stimulation of insulin release by SL 84.0418, a new alpha 2-adrenoceptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 254: 27-33, 1994
- KANETO H, MATSUOKA T A, MIYATSUKA T, KAWAMORI D, KATAKAMI N, YAMASAKI Y and MATSUHISA M: PDX-1 functions as a master factor in the pancreas. *Front Biosci* 13: 6406-20, 2008
- KAWAKI J, NAGASHIMA K, TANAKA J, MIKI T, MIYAZAKI M, GONOI T, MITSUHASHI N, NAKAJIMA N, IWANAGA T, YANO H and SEINO S: Unresponsiveness to glibenclamide during chronic treatment induced by reduction of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. *Diabetes* 48: 2001-6, 1999
- KERNER W, BRÜCKEL J and BÖHM BO: Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. Aktualisierte Version auf den Webseiten der DDG., [www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/](http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/) Evidenzbasierte Leitlinien/Definition. Scherbaum WA, Kiess W (Hrsg.). Oktober 2004 1, 2004
- KJEMS L L, RAVIER M A, JONAS J C and HENQUIN J C: Do oscillations of insulin secretion occur in the absence of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> oscillations in beta-cells? *Diabetes* 51 Suppl 1: S177-82, 2002
- KNOCH K P, BERGERT H, BORGONOVO B, SAEGER H D, ALTKRUGER A, VERKADE P and SOLIMENA M: Polypyrimidine tract-binding protein promotes insulin secretory granule biogenesis. *Nat Cell Biol* 6: 207-14, 2004
- LACY P E and KOSTIANOVSKY M: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16: 35-9, 1967
- LAEMMLI U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5, 1970
- LANDAZURI N, KRISHNA D, GUPTA M and LE DOUX J M: Retrovirus-polymer complexes: study of the factors affecting the dose response of transduction. *Biotechnol Prog* 23: 480-7, 2007

- LEBOVITZ H E: alpha-Glucosidase inhibitors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 26: 539-51, 1997
- LENZEN S: Insulin secretion by isolated perfused rat and mouse pancreas. *Am J Physiol* 236: E391-400, 1979
- LENZEN S, LERCH M, PECKMANN T and TIEDGE M: Differential regulation of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in mouse pancreatic islets by glucose, alpha-ketoisocaproic acid, glyceraldehyde and glycolytic intermediates. *Biochim Biophys Acta* 1523: 65-72, 2000
- LENZEN S and PANTEN U: Signal recognition by pancreatic B-cells. *Biochem Pharmacol* 37: 371-8, 1988
- LENZEN S and PECKMANN T: Effects of tolbutamide and N-benzoyl-D-phenylalanine (NBDP) on the regulation of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in mouse pancreatic islets. *Biochem Pharmacol* 62: 923-8, 2001
- LENZEN S and TIEDGE M: Regulation of pancreatic B-cell glucokinase and GLUT2 glucose transporter gene expression. *Biochem Soc Trans* 22: 1-6, 1994
- LERNMARK A: The preparation of, and studies on, free cell suspensions from mouse pancreatic islets. *Diabetologia* 10: 431-8, 1974
- LEWIS P, HENSEL M and EMERMAN M: Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *Embo J* 11: 3053-8, 1992
- LIDDELL E: Antikörper-Techniken. Heidelberg [u.a.], Spektrum, Akad. Verl., 1996
- LINDL T: Zell- und Gewebekultur : Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. Stuttgart, Fischer, 2002
- LOHSE M J: Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta* 1179: 171-88, 1993
- LUTHER M J, HAUGE-EVANS A, SOUZA K L, JORNS A, LENZEN S, PERSAUD S J and JONES P M: MIN6 beta-cell-beta-cell interactions influence insulin secretory responses to nutrients and non-nutrients. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 99-104, 2006
- MA L, BINDOKAS V P, KUZNETSOV A, RHODES C, HAYS L, EDWARDSON J M, UEDA K, STEINER D F and PHILIPSON L H: Direct imaging shows that insulin granule exocytosis occurs by complete vesicle fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9266-71, 2004
- MACDONALD M J, FAHIEN L A, BROWN L J, HASAN N M, BUSS J D and KENDRICK M A: Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E1-15, 2005
- MACDONALD P E, EL-KHOLY W, RIEDEL M J, SALAPATEK A M, LIGHT P E and WHEELER M B: The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 51 Suppl 3: S434-42, 2002



- MACFARLANE W M, SHEPHERD R M, COSGROVE K E, JAMES R F, DUNNE M J and DOCHERTY K: Glucose modulation of insulin mRNA levels is dependent on transcription factor PDX-1 and occurs independently of changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . *Diabetes* 49: 418-23, 2000
- MATSCHINSKY F M: Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45: 223-41, 1996
- MATTHEWS D R, CULL C A, STRATTON I M, HOLMAN R R and TURNER R C: UKPDS 26: Sulphonylurea failure in non-insulin-dependent diabetic patients over six years. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Diabet Med* 15: 297-303, 1998
- MATTHEWS E K: Calcium and Hormone Release. *Calcium and Cellular function*. London, Macmillan, AW Cuthbert: 163-182, 1970
- MATZ M V, FRADKOV A F, LABAS Y A, SAVITSKY A P, ZARAIKY A G, MARKELOV M L and LUKYANOV S A: Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 17: 969-73, 1999
- MAYER G and TABERNER P V: Effects of the imidazoline ligands efaroxan and KU14R on blood glucose homeostasis in the mouse. *Eur J Pharmacol* 454: 95-102, 2002
- MEGLASSON M D and MATSCHINSKY F M: Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes Metab Rev* 2: 163-214, 1986
- MEGLASSON M D, NELSON J, NELSON D and ERECINSKA M: Bioenergetic response of pancreatic islets to stimulation by fuel molecules. *Metabolism* 38: 1188-95, 1989
- MEIER J J: Beta cell mass in diabetes: a realistic therapeutic target? *Diabetologia* 51: 703-13, 2008
- MEIER J J, GALLWITZ B and NAUCK M A: Glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide: potential applications in type 2 diabetes mellitus. *BioDrugs* 17: 93-102, 2003
- MEIER J J and NAUCK M A: Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in biology and pathology. *Diabetes Metab Res Rev* 21: 91-117, 2005
- MELLOUL D, TSUR A and ZANGEN D: Pancreatic Duodenal Homeobox (PDX-1) in health and disease. *J Pediatr Endocrinol Metab* 15: 1461-72, 2002
- MICHAEL D J, CAI H, XIONG W, OUYANG J and CHOW R H: Mechanisms of peptide hormone secretion. *Trends Endocrinol Metab* 17: 408-15, 2006
- MICHAEL D J, GENG X, CAWLEY N X, LOH Y P, RHODES C J, DRAIN P and CHOW R H: Fluorescent cargo proteins in pancreatic beta-cells: design determines secretion kinetics at exocytosis. *Biophys J* 87: L03-5, 2004
- MITCHELL P and MOYLE J: Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* 213: 137-9, 1967

- MIYAZAKI J, ARAKI K, YAMATO E, IKEGAMI H, ASANO T, SHIBASAKI Y, OKA Y and YAMAMURA K: Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* 127: 126-32, 1990
- MOLDERINGS J G: Imidazoline receptors: Basic knowledge, recent advances and future prospects for therapy and diagnosis. *Drugs Fut.* 22: 757-772, 1997
- MONKS L K, COSGROVE K E, DUNNE M J, RAMSDEN C A, MORGAN N G and CHAN S L: Affinity isolation of imidazoline binding proteins from rat brain using 5-amino-efaroxan as a ligand. *FEBS Lett* 447: 61-4, 1999
- MOSKALEWSKI S: Isolation and Culture of the Islets of Langerhans of the Guinea Pig. *Gen Comp Endocrinol* 44: 342-53, 1965
- MUDALIAR S and HENRY R R: New oral therapies for type 2 diabetes mellitus: The glitazones or insulin sensitizers. *Annu Rev Med* 52: 239-57, 2001
- MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S, SAIKI R, HORN G and ERLICH H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73, 1986
- NEHER E: Vesicle pools and  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20: 389-99, 1998
- NEHER E and MARTY A: Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 6712-6, 1982
- NESHER R and CERASI E: Modeling phasic insulin release: immediate and time-dependent effects of glucose. *Diabetes* 51 Suppl 1: S53-9, 2002
- NICHOLS C G and LOPATIN A N: Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* 59: 171-91, 1997
- NORMAN P and RABASEDA X: Nateglinide: A structurally novel, short-acting, hypoglycemic agent. *Drugs Today (Barc)* 37: 411-426, 2001
- OHARA-IMAIZUMI M, NAKAMICHI Y, TANAKA T, ISHIDA H and NAGAMATSU S: Imaging exocytosis of single insulin secretory granules with evanescent wave microscopy: distinct behavior of granule motion in biphasic insulin release. *J Biol Chem* 277: 3805-8, 2002a
- OHARA-IMAIZUMI M, NAKAMICHI Y, TANAKA T, KATSUTA H, ISHIDA H and NAGAMATSU S: Monitoring of exocytosis and endocytosis of insulin secretory granules in the pancreatic beta-cell line MIN6 using pH-sensitive green fluorescent protein (pHluorin) and confocal laser microscopy. *Biochem J* 363: 73-80, 2002b

- OHARA-IMAIZUMI M, NISHIWAKI C, KIKUTA T, NAGAI S, NAKAMICHI Y and NAGAMATSU S: TIRF imaging of docking and fusion of single insulin granule motion in primary rat pancreatic beta-cells: different behaviour of granule motion between normal and Goto-Kakizaki diabetic rat beta-cells. *Biochem J* 381: 13-8, 2004
- OHEIM M, LOERKE D, STUHMER W and CHOW R H: The last few milliseconds in the life of a secretory granule. Docking, dynamics and fusion visualized by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). *Eur Biophys J* 27: 83-98, 1998
- OIE H K, GAZDAR A F, MINNA J D, WEIR G C and BAYLIN S B: Clonal analysis of insulin and somatostatin secretion and L-dopa decarboxylase expression by a rat islet cell tumor. *Endocrinology* 112: 1070-5, 1983
- OLOFSSON C S, GOPEL S O, BARG S, GALVANOVSKIS J, MA X, SALEHI A, RORSMAN P and ELIASSON L: Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic B-cells. *Pflugers Arch* 444: 43-51, 2002
- ORT T, VORONOV S, GUO J, ZAWALICH K, FROEHNER S C, ZAWALICH W and SOLIMENA M: Dephosphorylation of beta2-syntrophin and  $\text{Ca}^{2+}$ /mu-calpain-mediated cleavage of ICA512 upon stimulation of insulin secretion. *Embo J* 20: 4013-23, 2001
- PANTEN U: Mechanism of insulin secretion and its modulation by sulfonylureas. *Contrib Nephrol* 73: 16-21; discussion 22-3, 1989
- PANTEN U, ISHIDA H, SCHAUDER P, FRERICHS H and HASSELBLATT A: A versatile microperfusion system. *Anal Biochem* 82: 317-26, 1977
- PANTEN U, SCHWANSTECHER M, WALLASCH A and LENZEN S: Glucose both inhibits and stimulates insulin secretion from isolated pancreatic islets exposed to maximally effective concentrations of sulfonylureas. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 338: 459-62, 1988
- PLANT T D and HENQUIN J C: Phentolamine and yohimbine inhibit ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channels in mouse pancreatic beta-cells. *Br J Pharmacol* 101: 115-20, 1990
- PLOEM J S: Fluorescence microscopy. *Fluorescent and luminescent probes for biological activity. A practical guide to technology for quantitative real-time analysis.*, Mason WT, San Diego, Academic Press: 1-11, 1993
- POITOUT V, HAGMAN D, STEIN R, ARTNER I, ROBERTSON R P and HARMON J S: Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J Nutr* 136: 873-6, 2006
- POULI A E, EMMANOUILIDOU E, ZHAO C, WASMEIER C, HUTTON J C and RUTTER G A: Secretory-granule dynamics visualized in vivo with a phogrin-green fluorescent protein chimera. *Biochem J* 333 ( Pt 1): 193-9, 1998a

- POULI A E, KENNEDY H J, SCHOFIELD J G and RUTTER G A: Insulin targeting to the regulated secretory pathway after fusion with green fluorescent protein and firefly luciferase. *Biochem J* 331 ( Pt 2): 669-75, 1998b
- PRATLEY R E, FOLEY J E and DUNNING B E: Rapid acting insulinotropic agents: restoration of early insulin secretion as a physiologic approach to improve glucose control. *Curr Pharm Des* 7: 1375-97, 2001
- PRAZ G A, HALBAN P A, WOLLHEIM C B, BLONDEL B, STRAUSS A J and RENOLD A E: Regulation of immunoreactive-insulin release from a rat cell line (RINm5F). *Biochem J* 210: 345-52, 1983
- PRENTKI M: New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur J Endocrinol* 134: 272-86, 1996
- PROKS P and ASHCROFT F M: Phentolamine block of  $K_{ATP}$  channels is mediated by  $Kir_{6.2}$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11716-20, 1997
- RAVIER M A, SEHLIN J and HENQUIN J C: Disorganization of cytoplasmic  $Ca^{(2+)}$  oscillations and pulsatile insulin secretion in islets from ob/ ob mice. *Diabetologia* 45: 1154-63, 2002
- ROBERTSON R P and PORTE D, JR.: Adrenergic modulation of basal insulin secretion in man. *Diabetes* 22: 1-8, 1973
- RORSMAN P, ASHCROFT F M and TRUBE G: Single Ca channel currents in mouse pancreatic B-cells. *Pflugers Arch* 412: 597-603, 1988
- RORSMAN P, ELIASSEN L, RENSTROM E, GROMADA J, BARG S and GOPEL S: The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci* 15: 72-77, 2000
- RUSTENBECK I: Desensitization of insulin secretion. *Biochem Pharmacol* 63: 1921-35, 2002
- RUSTENBECK I, DICKEL C and GRIMMSMANN T: Desensitization of insulin secretory response to imidazolines, tolbutamide, and quinine. II. Electrophysiological and fluorimetric studies. *Biochem Pharmacol* 62: 1695-703, 2001a
- RUSTENBECK I, HERRMANN C, RATZKA P and HASSELBLATT A: Imidazoline/guanidinium binding sites and their relation to inhibition of  $K(ATP)$  channels in pancreatic B-cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 356: 410-7, 1997
- RUSTENBECK I, KOPP M, RATZKA P, LEUPOLT L and HASSELBLATT A: Imidazolines and the pancreatic B-cell. Actions and binding sites. *Ann N Y Acad Sci* 881: 229-40, 1999
- RUSTENBECK I, KRAUTHEIM A, JORNS A and STEINFELDER H J: Beta-cell toxicity of ATP-sensitive  $K^+$  channel-blocking insulin secretagogues. *Biochem Pharmacol* 67: 1733-41, 2004a

- RUSTENBECK I, WIENBERGEN A, BLECK C and JORNS A: Desensitization of insulin secretion by depolarizing insulin secretagogues. *Diabetes* 53 Suppl 3: S140-50, 2004b
- RUSTENBECK I, WINKLER M and JORNS A: Desensitization of insulin secretory response to imidazolines, tolbutamide, and quinine. I. Secretory and morphological studies. *Biochem Pharmacol* 62: 1685-94, 2001b
- RUTTER G A: Visualising insulin secretion. The Minkowski Lecture 2004. *Diabetologia* 47: 1861-72, 2004
- RUTTER G A and HILL E V: Insulin vesicle release: walk, kiss, pause ... then run. *Physiology (Bethesda)* 21: 189-96, 2006
- RUTTER G A and TSUBOI T: Kiss and run exocytosis of dense core secretory vesicles. *Neuroreport* 15: 79-81, 2004
- SALDEEN J, CUIEL D T, EIZIRIK D L, ANDERSSON A, STRANDELL E, BUSCHARD K and WELSH N: Efficient gene transfer to dispersed human pancreatic islet cells in vitro using adenovirus-polylysine/DNA complexes or polycationic liposomes. *Diabetes* 45: 1197-203, 1996
- SAMBROOK J and RUSSELL D W: Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- SAMOLS E and WEIR G C: Adrenergic modulation of pancreatic A, B, and D cells alpha-Adrenergic suppression and beta-adrenergic stimulation of somatostatin secretion, alpha-adrenergic stimulation of glucagon secretion in the perfused dog pancreas. *J Clin Invest* 63: 230-8, 1979
- SATO Y, AIZAWA T, KOMATSU M, OKADA N and YAMADA T: Dual functional role of membrane depolarization/ $\text{Ca}^{2+}$  influx in rat pancreatic B-cell. *Diabetes* 41: 438-43, 1992
- SATO Y and HENQUIN J C: The  $\text{K}^{+}$ -ATP channel-independent pathway of regulation of insulin secretion by glucose: in search of the underlying mechanism. *Diabetes* 47: 1713-21, 1998
- SCHNELL A H, SWENNE I and BORG L A: Lysosomes and pancreatic islet function. A quantitative estimation of crinophagy in the mouse pancreatic B-cell. *Cell Tissue Res* 252: 9-15, 1988
- SCHUIT F C, HUYPENS P, HEIMBERG H and PIPELEERS D G: Glucose sensing in pancreatic beta-cells: a model for the study of other glucose-regulated cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes* 50: 1-11, 2001
- SCHULZ A and HASSELBLATT A: Phentolamine, a deceptive tool to investigate sympathetic nervous control of insulin release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337: 637-43, 1988
- SCHULZ A and HASSELBLATT A: Dual action of clonidine on insulin release: suppression, but stimulation when alpha 2-adrenoceptors are blocked. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 340: 712-4, 1989a

- SCHULZ A and HASSELBLATT A: An insulin-releasing property of imidazoline derivatives is not limited to compounds that block alpha-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 340: 321-7, 1989b
- SEGHERS V, NAKAZAKI M, DEMAYO F, AGUILAR-BRYAN L and BRYAN J: Sur1 knockout mice. A model for K(ATP) channel-independent regulation of insulin secretion. *J Biol Chem* 275: 9270-7, 2000
- SHANER N C, STEINBACH P A and TSIEN R Y: A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2: 905-9, 2005
- SIMPSON A W: Fluorescent measurement of  $[Ca^{2+}]_i$ : Basic practical considerations. *Calcium Signaling Protocols* D. G. Lambert. Totowa (New Jersey), Humana Press, 1999
- SONEOKA Y, CANNON P M, RAMSDALE E E, GRIFFITHS J C, ROMANO G, KINGSMAN S M and KINGSMAN A J: A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* 23: 628-33, 1995
- STRAUB S G and SHARP G W: Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 18: 451-63, 2002
- STUMVOLL M and HARING H U: Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms. *Ann Med* 34: 217-24, 2002
- TAGUCHI N, AIZAWA T, SATO Y, ISHIHARA F and HASHIZUME K: Mechanism of glucose-induced biphasic insulin release: physiological role of adenosine triphosphate-sensitive  $K^+$  channel-independent glucose action. *Endocrinology* 136: 3942-8, 1995
- TAKAHASHI N, NEMOTO T, KIMURA R, TACHIKAWA A, MIWA A, OKADO H, MIYASHITA Y, IINO M, KADOWAKI T and KASAI H: Two-photon excitation imaging of pancreatic islets with various fluorescent probes. *Diabetes* 51 Suppl 1: S25-8, 2002
- TERSKIKH A, FRADKOV A, ERMAKOVA G, ZARAIKY A, TAN P, KAJAVA A V, ZHAO X, LUKYANOV S, MATZ M, KIM S, WEISSMAN I and SIEBERT P: "Fluorescent timer": protein that changes color with time. *Science* 290: 1585-8, 2000
- THEWS G: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. Stuttgart, Wiss. Verl.-Ges., 2007
- TIAN Y A, JOHNSON G and ASHCROFT S J: Sulfonylureas enhance exocytosis from pancreatic beta-cells by a mechanism that does not involve direct activation of protein kinase C. *Diabetes* 47: 1722-6, 1998
- TRUBE G, RORSMAN P and OHNO-SHOSAKU T: Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent  $K^+$  channel in mouse pancreatic beta-cells. *Pflugers Arch* 407: 493-9, 1986

- TURNER R C, HARRIS E, OUNSTED M and PONSFORD C: Two abnormalities of glucose-induced insulin secretion: dose-response characteristics and insulin sensitivity. *Acta Endocrinol (Copenh)* 92: 148-65, 1979
- UKPDS: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 352: 837-53, 1998
- VERKHUSHA V V and LUKYANOV K A: The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat Biotechnol* 22: 289-96, 2004
- VERMA I M and SOMIA N: Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 389: 239-42, 1997
- WATKINS S, GENG X, LI L, PAPWORTH G, ROBBINS P D and DRAIN P: Imaging secretory vesicles by fluorescent protein insertion in propeptide rather than mature secreted peptide. *Traffic* 3: 461-71, 2002
- WEBER M, DENG S, KUCHER T, SHAKED A, KETCHUM R J and BRAYMAN K L: Adenoviral transfection of isolated pancreatic islets: a study of programmed cell death (apoptosis) and islet function. *J Surg Res* 69: 23-32, 1997
- WEIR G C and BONNER-WEIR S: Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3: S16-21, 2004
- WICKSTEED B, ALARCON C, BRIAUD I, LINGOHR M K and RHODES C J: Glucose-induced translational control of proinsulin biosynthesis is proportional to preproinsulin mRNA levels in islet beta-cells but not regulated via a positive feedback of secreted insulin. *J Biol Chem* 278: 42080-90, 2003
- WIEGAND U K, DUNCAN R R, GREAVES J, CHOW R H, SHIPSTON M J and APPS D K: Red, yellow, green go!--A novel tool for microscopic segregation of secretory vesicle pools according to their age. *Biochem Soc Trans* 31: 851-6, 2003
- WIENBERGEN A: Die cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Pankreasinseln als Vermittler der insulinotropen Wirkung von Glucose-selektiven und nicht Glucoseselektiven Stimuli, Technische Universität Braunschweig, 2006
- WIENBERGEN A, BLECK C, LACKMANN T G and RUSTENBECK I: Antagonism of the insulinotropic action of first generation imidazolines by openers of K(ATP) channels. *Biochem Pharmacol* 73: 94-102, 2007
- WOLLEN N and BAILEY C J: Inhibition of hepatic gluconeogenesis by metformin. Synergism with insulin. *Biochem Pharmacol* 37: 4353-8, 1988a
- WOLLEN N and BAILEY C J: Metformin potentiates the antigluconeogenic action of insulin. *Diabete Metab* 14: 88-91, 1988b
- YANG S N and BERGGREN P O: Beta-cell  $\text{CaV}$  channel regulation in physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E16-28, 2005

- YANG X, XU P and XU T: A new pair for inter- and intra-molecular FRET measurement. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 914-20, 2005
- YORDE D E and KALKHOFF R K: Morphometric studies of secretory granule distribution and association with microtubules in beta-cells of rat islets during glucose stimulation. *Diabetes* 36: 905-13, 1987
- ZAITSSEV S V, EFANOV A M, EFANOVA I B, LARSSON O, OSTENSON C G, GOLD G, BERGGREN P O and EFENDIC S: Imidazoline compounds stimulate insulin release by inhibition of K(ATP) channels and interaction with the exocytotic machinery. *Diabetes* 45: 1610-8, 1996
- ZAITSSEV S V, EFANOV A M, RAAP A, EFANOVA I B, SCHLOOS J, STECKELHAMANN B, LARSSON O, OSTENSON C G, BERGGREN P O, MEST H J and EFENDIC S: Different modes of action of the imidazoline compound RX871024 in pancreatic beta-cells. Blocking of K<sup>+</sup> channels, mobilization of Ca<sup>2+</sup> from endoplasmic reticulum, and interaction with exocytotic machinery. *Ann N Y Acad Sci* 881: 241-52, 1999
- ZIMMET P, ALBERTI K G and SHAW J: Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-7, 2001
- ZUFFEREY R, DONELLO J E, TRONO D and HOPE T J: Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73: 2886-92, 1999
- ZUFFEREY R, DULL T, MANDEL R J, BUKOVSKY A, QUIROZ D, NALDINI L and TRONO D: Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72: 9873-80, 1998
- ZUFFEREY R, NAGY D, MANDEL R J, NALDINI L and TRONO D: Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15: 871-5, 1997



## 8. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	intrazelluläre Calciumionenkonzentration
°C	Grad Celsius
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
Abb.	Abbildung
ADA	American Diabetes Association
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AM	Acetoxymethyl-
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan- N,N,N',N'-tetraessigsäure
bp	Basenpaare
BP	Bandpassfilter
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CCD	charge coupled devices
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
cm	Zentimeter
CPH	Carboxy-Peptidase H
cps	counts per second
DIC	Differentieller Interferenzkontrast
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPP IV	Dipeptidyl peptidase IV
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EM	Elektronen-Mikroskopie
EZ	extrazelluläre Lösung
Fa.	Firma
FAD	oxidiertes Flavin-Adenin-Dinucleotid
FADH <sub>2</sub>	reduziertes Flavin-Adenin-Dinucleotid
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FRET	fluorescence resonance energy transfer
g	Erdbeschleunigung

---

GIP	glucose-dependent insulin-releasing peptide, früher gastric inhibitory peptide
GK	Glucokinase
GLP-1	glucagon-like peptide 1
GLUT-2	Glucosetransporter, Subtyp 2
h	Stunde
HC	hard coated
HRP	Meerrettich-Peroxidase
rIAPP	Insel Amyloid Polypeptid (der Ratte)
K <sub>ATP</sub> -Kanal	ATP-sensitiver Kaliumkanal
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K <sub>IR</sub> 6.2	einwärtsgerichteter (inward rectifier) Kalium-Kanal, Subtyp 6.2
K <sub>m</sub> -Wert	Michaelis-Konstante
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LDCVs	large dense core vesicles
LP	Langpassfilter
LTR	long terminal repeat
M	molar
m/v	Massenanteile bezogen auf das Gesamtvolumen
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
ms	Millisekunden
N	Normal
NAD	oxidiertes Nicotinamid-Adenosindinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenosindinucleotid
NADP	oxidiertes Nicotinamid-Adenosindinucleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenosindinucleotidphosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMRI	Naval medical research institute , USA
Ø	Durchmesser
OAD	orale Antidiabetika
OD	optische Dichte
OGTT	Oraler Glucose-Toleranztest
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

---

PC	Pyruvat-Carboxylase
PC 1 bzw. 2	Prohormon-Convertase 1 bzw. 2
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PDX-1	pancreatic and duodenal homebox 1
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Pikomol
PP	Pankreatisches Polypeptid
PPAR $\gamma$	peroxisome proliferator activated receptor, Subtyp $\gamma$
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RRP	readily releasable pool
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
s.	siehe
SEM	Standardfehler der Mittelwerte ( <i>Standard Error of Means</i> )
SNARF	Seminaphthorhodafluor
sog.	sogenannt
SUR1	Sulfonylharnstoffrezeptor, Subtyp 1
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TIRFM	total internal reflection fluorescence microscopy
U	Einheit
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteile bezogen auf das Gesamtvolumen
VDCC	spannungsabhängiger Calciumionenkanal (voltage-dependent Ca <sup>2+</sup> channel)
vgl.	vergleiche
VIP	vasoactive intestinal polypeptide
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
$\Delta\psi$	Änderung des Membranpotentials bzw. Depolarisation

**Abkürzungsverzeichnis der Aminosäuren**

<b>A</b> (Ala)	Alanin	<b>G</b> (Gly)	Glycin	<b>P</b> (Pro)	Prolin
<b>R</b> (Arg)	Arginin	<b>H</b> (His)	Histidin	<b>S</b> (Ser)	Serin
<b>N</b> (Asn)	Asparagin	<b>I</b> (Ile)	Isoleucin	<b>T</b> (Thr)	Threonin
<b>D</b> (Asp)	Asparaginsäure	<b>L</b> (Leu)	Leucin	<b>W</b> (Trp)	Tryptophan
<b>C</b> (Cys)	Cystein	<b>K</b> (Lys)	Lysin	<b>Y</b> (Tyr)	Tyrosin
<b>E</b> (Glu)	Glutaminsäure	<b>M</b> (Met)	Methionin	<b>V</b> (Val)	Valin
<b>Q</b> (Gln)	Glutamin	<b>F</b> (Phe)	Phenylalanin		